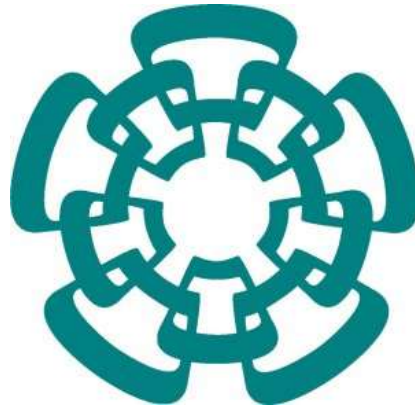


**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
IRAPUATO**



**“Los factores de transcripción *WIP* participan en la
determinación del tamaño de las hojas en *Arabidopsis
thaliana*”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
CON LA ESPECIALIDAD EN
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS
PRESENTA
BIÓL. URY SARAI DÍAZ GARCÍA
DIRECTORA DE TESIS
DRA. NAYELLI MARSCH MARTÍNEZ

Irapuato, Guanajuato

Junio, 2017

El presente trabajo de tesis fue llevado a cabo en el Laboratorio de Identidad Celular del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del CINVESTAV Unidad Irapuato, bajo la dirección de la Dra. Nayelli Marsch Martínez.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por la beca de posgrado otorgada para la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados CINVESTAV Irapuato, por su apoyo humano y material, proporcionados a lo largo del posgrado.

A la Dra. Nayelli Marsch Martínez por permitirme ser parte del grupo de trabajo de Identidad Celular, por contagiarnos su entusiasmo y positividad, por su paciencia para enseñar, por su apoyo a nuestros proyectos, por estar siempre pendiente no solo de nuestro trabajo, también de nosotros.

A la Dra. Gertrud Lund y al Dr. Sean M. Rovito, por ser parte del Comité de asesores y por sus comentarios y sugerencias aportadas al trabajo.

Al Dr. Lino Sánchez por su apoyo técnico en el uso del microscopio.

Al Laboratorio de Identidad Celular: A Juan Carlos Ochoa, auxiliar del laboratorio, gracias por su apoyo técnico, a Bety, Yolanda, David, gracias por las dudas aclaradas, por su apoyo en el laboratorio, por compartir su solución GUS, su medio MS, etc.; por los momentos graciosos, por las lindas sesiones de limpieza en el laboratorio... pero sobre todo gracias por su amistad. A los miembros temporales que aportaron un toque diferente al lab, Pablo, Israel, Leandro, Lupita, Luisa, Ricardo. Les deseo lo mejor en cada uno de sus caminos.

A Eric por tantas risas y momentos agradables compartidos, a Erika, por estar a mi lado apoyándome.

Al club bikero, Tzitzí por esa súper aventura al Plant Biology, por enseñarnos lo bonito que es Pátzcuaro, por las pláticas, por tu café; a Ismael, por tu sencillez, por tu confianza, por tu machaca sinaloense; a Gil por tu positividad, por tu entusiasmo que contagias, a David, por ser mi roomie, mi colega *WIP*, por aclarar dudas de mi trabajo, por tu ayuda en los análisis estadísticos, pero sobre todo por ser mi amigo. Gracias por ser mi familia en Irapuato.

A todos mis compañeros y amigos de CINVESTAV, Marissa, Baruch, Mary, Charly, Marisol, Gaby, Lala, Michael, Ana, Ahiko, Orlando, Obed, Génesis, Gerardo. Me dio gusto poder compartir con ustedes una taza de café, una plática, un viaje, etc.

A la familia Marsch-Martínez y de Folter-Marsch, por darme hospedaje, muchas gracias.

DEDICATORIA

A Michelli, Benjamín, Carlos y a mi mamá Lidia; con profundo amor y cariño.
Gracias por estar conmigo siempre, por inspirarme a seguir adelante y ser mi motivación.

	ÍNDICE	
1	INTRODUCCIÓN	
1.1	Las Plantas.....	1
1.2	Desarrollo y crecimiento vegetal.....	2
1.3	Desarrollo del cuerpo en plantas vasculares.....	2
1.4	Meristemos.....	4
1.5	Epidermis.....	4
1.6	El Tallo.....	6
1.7	La hoja.....	7
1.8	Desarrollo de la hoja.....	8
1.9	Factores que influyen en la forma y tamaño final de la hoja.....	9
2	ANTECEDENTES	11
2.1	Factores de transcripción (FTs).....	11
2.2	Factores de transcripción con dedos de zinc.....	12
2.3	<i>WIP</i> en plantas.....	12
2.4	<i>WIP</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
2.5	<i>WIP1</i>	13
2.6	<i>WIP6</i>	13
2.7	<i>WIP2</i>	14
2.8	Patrón de expresión p <i>WIP2</i> ::GUS.....	15
2.9	<i>wip3</i> , <i>wip2 wip3</i>	16
2.10	<i>wip2</i> , <i>wip2 wip5</i>	17
2.11	<i>wip2 wip4 wip5 (nww)</i>	18
2.12	Estudios previos sobre la morfología y el tamaño de la hoja.....	18
3	HIPÓTESIS	21
4	OBJETIVO	21
4.1	OBJETIVO GENERAL.....	21
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
5	MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1	Genotipos, condiciones de crecimiento y manejo de material biológico.....	22
5.2	Evaluación del tiempo de floración.....	22
5.3	Evaluación del tamaño de las hojas de la roseta.....	23

5.4	Evaluación del área de las células de la epidermis de la hoja de la roseta.....	24
5.5	Evaluación del número de células en la epidermis de la hoja de la roseta.....	25
5.6	Análisis histológico de tallos de <i>Wt</i> , <i>wip2</i> , <i>wip5</i> , <i>wip2 wip5</i>	25
5.7	Evaluación de la expresión de <i>WIP2</i> mediante el gen reportero GUS.....	26
5.8	Análisis Estadísticos.....	26
6	RESULTADOS.....	27
6.1	Evaluación del tiempo de floración: a) Número de días transcurridos desde la germinación hasta la aparición de los capullos de la inflorescencia (ddgf) y b) Número de hojas en la roseta cuando los capullos de la inflorescencia son visibles en el ápice (nhf).....	27
	6.1.1. Evaluación del ddgf en mutantes sencillas <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , y doble mutante <i>wip2 wip3</i> en otoño.....	27
	6.1.2 Evaluación del nhf en mutantes sencillas <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , y doble mutante <i>wip2 wip3</i> en otoño.....	28
	6.1.3 Evaluación del ddgf en mutantes sencillas <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip4</i> , <i>wip5</i> , dobles mutantes <i>wip2 wip3</i> y <i>wip2 wip5</i> en primavera.....	29
	6.1.4 Evaluación del nhf en mutantes sencillas <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip4</i> , <i>wip5</i> , dobles mutantes <i>wip2 wip3</i> y <i>wip2 wip5</i> en primavera.....	30
6.2	Evaluación de la hoja de la roseta a 30 ddg y 60 ddg	32
	6.2.1 Evaluación del área de la hoja de la roseta en mutantes sencillas <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip4</i> , <i>wip5</i> , dobles mutantes <i>wip2 wip3</i> y <i>wip2 wip5</i> a los 30 días después de la germinación (30 ddg).....	33
	6.2.2 Evaluación del área de las células de la epidermis de la hoja de la roseta en mutantes sencillas <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip4</i> , <i>wip5</i> , dobles mutantes <i>wip2 wip3</i> y <i>wip2 wip5</i> a los 30 días después de la germinación (30 ddg).....	34

	6.2.3 Evaluación del número de células de la epidermis de la hoja de la roseta en mutantes sencillas <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip4</i> , <i>wip5</i> , dobles mutantes <i>wip2 wip3</i> y <i>wip2 wip5</i> a los 30 días después de la germinación (30 ddg).....	35
	6.2.4 Evaluación del área de la hoja de la roseta en mutantes sencillas <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip4</i> , <i>wip5</i> , dobles mutantes <i>wip2 wip3</i> y <i>wip2 wip5</i> a los 60 días después de la germinación (60 ddg).....	36
	6.2.5 Evaluación del área de las células de la epidermis de la hoja de la roseta de mutantes sencillas <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip4</i> , <i>wip5</i> , dobles mutantes <i>wip2 wip3</i> y <i>wip2 wip5</i> a los 60 días después de la germinación (60 ddg).....	37
	6.2.6 Evaluación del número de células en la epidermis de la hoja de la roseta de mutantes sencillas <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip4</i> , <i>wip5</i> , dobles mutantes <i>wip2 wip3</i> , <i>wip2 wip5</i> a los 60 días después de la germinación (60 ddg).....	38
6.3	Evaluación histológica de los tejidos internos del tallo en <i>wip2</i>, <i>wip5</i> y <i>wip2 wip5</i> comparados con la planta silvestre Wt.....	39
6.4	Evaluación de la expresión de <i>WIP2</i>, mediante el gen reportero <i>GUS</i>.....	41
7	DISCUSIÓN.....	44
7.1	El tiempo de floración en <i>Arabidopsis</i> está afectado ligeramente en las mutantes <i>wip3</i> y <i>wip2 wip5</i>	44
7.2	Los genes <i>WIP4</i> y <i>WIP2 WIP5</i> afectan el tamaño final de la hoja de la roseta en <i>Arabidopsis</i>	45
7.3	La arquitectura de los haces vasculares está afectada en la doble mutante <i>wip2 wip5</i>	48
7.4	<i>WIP2</i> se expresa en la vasculatura y tejidos jóvenes.....	49
8	CONCLUSIONES.....	51
9	PERSPECTIVAS.....	52
10	LITERATURA CITADA.....	53
11	ANEXOS.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Número de figura	Título	Página
Figura 1	Alineamiento de aminoácidos del dominio WIP de los seis miembros de esta familia de factores de transcripción y la estructura representativa de uno de ellos	12
Figura 2	Fenotipos de las diferentes mutantes <i>wip</i> (mutantes sencillas y triple)	15
Figura 3	Patrón de expresión de <i>WIP2</i> en el meristemo apical del tallo durante etapas tempranas del desarrollo de la plántula	16
Figura 4	Observaciones previas de fenotipos alterados de <i>wip2</i> , <i>wip5</i> y <i>wip3</i> en el laboratorio de Identidad Celular	17
Figura 5	Rosetas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
Figura 6	Número de días transcurridos desde la germinación hasta la aparición de los capullos de la inflorescencia (ddgf) en <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip2 wip3</i> y <i>Wt</i> , en otoño	28
Figura 7	Número de hojas en la roseta cuando los capullos de la inflorescencia son visibles en el ápice (nhf) en <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip2 wip3</i> y <i>Wt</i> , en otoño.	29
Figura 8	Número de días transcurridos desde la germinación hasta la aparición de los capullos de la inflorescencia (ddgf) en <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip4</i> , <i>wip5</i> , <i>wip2 wip3</i> , <i>wip2 wip5</i> y <i>Wt</i> , en primavera	30
Figura 9	Número de hojas en la roseta cuando los capullos de la inflorescencia son visibles en el ápice (nhf) en <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip4</i> , <i>wip5</i> , <i>wip2 wip3</i> , <i>wip2 wip5</i> y <i>Wt</i> , en primavera	31
Figura 10	Micrografías de hoja completa y de células de la epidermis de hoja de la roseta de <i>Arabidopsis</i> a los 30 ddg	32
Figura 11	Micrografías de hoja completa y de células de la epidermis de hoja de la roseta de <i>Arabidopsis</i> a los 60 ddg	33
Figura 12	Área de la hoja de la roseta a 30 días después de la germinación (30 ddg) de <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip4</i> , <i>wip5</i> , <i>wip2 wip3</i> , <i>wip2 wip5</i> y <i>Wt</i>	34
Figura 13	Área de las células de la epidermis de la hoja de la roseta a los 30 ddg en <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip4</i> , <i>wip5</i> , <i>wip2 wip3</i> , <i>wip2 wip5</i> y <i>Wt</i>	35
Figura 14	Número de células de la epidermis de la hoja de la roseta a los 30 ddg en <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip4</i> , <i>wip5</i> , <i>wip2 wip3</i> , <i>wip2 wip5</i> y <i>Wt</i>	36
Figura 15	Área de la hoja de la roseta a 60 días después de la germinación (60 ddg) de <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip4</i> , <i>wip5</i> , <i>wip2 wip3</i> , <i>wip2 wip5</i> y <i>Wt</i>	37
Figura 16	Área de las células de la epidermis de la hoja de la roseta a los 60 días después de la germinación (60 ddg) en <i>wip2</i> , <i>wip3</i> , <i>wip4</i> , <i>wip5</i> , <i>wip2 wip3</i> , <i>wip2 wip5</i> y <i>Wt</i> .	38
Figura 17	Análisis del número de las células de la hoja de la roseta a los 60 días después de la germinación (60 ddg) en	39

	<i>wip2, wip3, wip4, wip5, wip2 wip3, wip2 wip5</i> y Wt.	
Figura 18	Micrografías de cortes transversales de tallo teñidos con floroglucinol	40
Figura 19	Diámetro y número de haces vasculares del tallo en <i>wip2, wip5, wip2 wip5</i> comparados con la Wt	41
Figura 20	Micrografías de cortes transversales de tallos de <i>Arabidopsis thaliana</i> (parte basal del tallo)	42
Figura 21	Expresión de pWIP2::GUS en plantas de 40 ddg	43
Figura 22	Expresión de pWIP2::GUS en plántulas de 9 ddg	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
Tabla 1	Genotipos empleados para evaluar los efectos fenotípicos de la pérdida de función	22
Tabla 2	Reactivos utilizados para realizar la reacción GUS/Ferri-Ferro	26

RESUMEN

El adecuado desarrollo y funcionamiento de un organismo en gran parte se debe a la expresión diferencial de genes regulados por Factores de Transcripción (FTs). Los FTs son proteínas que se adhieren a secuencias específicas del ADN, activando o reprimiendo la expresión de genes. En el laboratorio de Identidad Celular estamos interesados en estudiar a una familia de factores de transcripción en *Arabidopsis thaliana* con motivos de dedos de zinc tipo C2H2, llamada *WIP*. Esta familia cuenta con seis miembros en esta planta. El miembro de la familia más ampliamente caracterizado es *WIP2*. Sin embargo, evidencia dada por análisis de líneas marcadoras ha demostrado que este gen se expresa en tejidos diferentes a los ya descritos previamente y es probable que sus funciones estén siendo enmascaradas, debido a una redundancia de funciones con los miembros de la familia más cercanos (*WIP4* y *WIP5*).

Para ampliar el conocimiento acerca de las posibles funciones que los miembros de la familia *WIP* llevan a cabo en *Arabidopsis*, así como la interacción genética entre ellos, analizamos los fenotipos de mutantes sencillas y dobles de *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3* y *wip2 wip5*. Basándonos en observaciones previas, decidimos analizar parámetros como el tiempo de floración evaluando el número de días transcurridos desde la germinación hasta la aparición de los capullos de la inflorescencia (ddgf) y número de hojas en la roseta cuando los capullos de la inflorescencia son visibles en el ápice (nhf), el tamaño de las hojas de la roseta, el área y número de las células de la epidermis de la hoja, y el diámetro del tallo y número de haces vasculares de los tallos. Además, se caracterizó la expresión de *WIP2*, en tejidos donde no ha sido explorada.

Respecto a la floración, se observó un retraso en el ddgf en *wip3* con respecto a la silvestre en otoño, mientras que *wip2 wip5* presentó un nhf menor que la Wt (Wild type o planta silvestre) durante la primavera. Sin embargo, estas diferencias fueron moderadas.

El área de la hoja y el área de las células de la epidermis fueron evaluadas en dos diferentes tiempos: a los 30 y 60 ddg. Mientras que la mayoría de los genotipos en el segundo tiempo, presentaron hojas de menor tamaño comparadas con la Wt, *wip4* y *wip2 wip5* presentaron un notable

incremento en el tamaño final de las hojas. El análisis del área de las células de la epidermis de la hoja, mostró que el número de células estaba disminuido en estas mutantes, pero el área celular era mayor, probablemente debido a un mecanismo de compensación que equilibró el tamaño final del órgano. Con los resultados obtenidos en ambos tiempos, concluimos que probablemente estos genes pueden estar controlando el tamaño de este órgano a través de la regulación de la división celular.

El diámetro del tallo y el número de haces vasculares también se vieron afectados en las mutantes, particularmente en *wip2* y *wip2 wip5*, aunque la interacción entre estos genes parece ser compleja. Finalmente, una exploración de la expresión de *WIP2* en tejidos anteriormente no estudiados, reveló la expresión en la vasculatura de la mayoría de los órganos analizados, lo cual se relaciona con los defectos detectados en la vasculatura. En conclusión, los resultados del presente trabajo indican claramente que estos FTs desempeñan otros roles además de los previamente conocidos, tales como el control del tamaño del órgano y el desarrollo de la vasculatura del tallo. Será interesante explorar los mecanismos moleculares por los cuales estos genes actúan en dichos procesos.

ABSTRACT

The correct development and function of an organism largely depends on the differential expression of genes regulated by Transcription Factors (TFs). TFs are proteins that bind to specific sequences in DNA and activate or repress gene expression. In the Cell Identity laboratory, we are interested in studying the *WIP* family of C2H2 TFs in *Arabidopsis thaliana*. This family has six members in this plant. *WIP2* is the most characterized member of the family. However, evidence from marker line analysis has shown that this gene is active in tissues for which no *WIP2* function has been yet reported, suggesting additional functions to those previously described. Most likely, such functions are masked due to functional redundancy with close members of the family (*WIP4* and *WIP5*).

In order to obtain information regarding novel functions of *WIP* family members in *Arabidopsis*, and their genetic interactions, we analyzed the phenotypes of the single and double mutants *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3* and *wip2 wip5*. Based on previous observations, we chose to analyze traits such as flowering time, rosette leaf size, epidermal cell area and number, and stem diameter and vascular bundle number. Moreover, we characterized the expression of *WIP2* in tissues where its expression has not been explored.

Moderate differences in the number of days and number of leaves at flowering were observed for *wip3* (in the autumn) and *wip2 wip5* (in spring), in comparison to wild type plants, respectively.

Leaf size and epidermal cell size and number were evaluated at two time points during development, 30 and 60 dag (days after germination). While most mutant genotypes presented smaller leaf sizes compared to wild type at the second time point, *wip4* and *wip2 wip5* presented a large increase in final leaf size. Epidermal cell analysis revealed that cell number was decreased in these mutants, but cell area was increased, probably due to a compensation mechanism that balanced final organ size. Using the data of both time points, we concluded that these genes may be controlling organ size through the regulation of cell division. Stem diameter and vascular bundle number were also affected in the mutants, particularly in *wip2* and *wip2 wip5*, though the interaction between these genes appears to be complex. Finally, an exploration of *WIP2* expression in previously unstudied tissues revealed that it is expressed

in the vasculature of most analyzed organs, which correlates well with the detected vasculature defects. In conclusion, the results of this work clearly indicate that, indeed, these TFs play broader roles than previously recognized, such as organ size control and stem vasculature development. It will be very interesting to explore the molecular mechanisms by which these genes act in these processes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Las plantas

Las plantas son organismos de vida sésil con gran complejidad en sus estructuras y en su fisiología, lo que les ha permitido adaptarse a diferentes hábitats (Nicolson *et al.*, 2011; Chitwood *et al.*, 2012). Para conocer y comprender dichos aspectos es necesario el estudio cuidadoso a niveles macroscópicos, microscópicos y moleculares (Haig y Westoby, 1991; Horvitz y Herskowitz, 1992; Francis *et al.*, 1998; Grossniklaus y Vielle-Calzada, 1998).

Las plantas con flor a pesar de su asombrosa variedad son de origen relativamente reciente. Los primeros ejemplos de fósiles conocidos son de 125 millones de años frente a los aproximadamente 350 millones de años de los animales vertebrados (Alberts, 2002).

Las plantas vasculares superiores son organismos dinámicos. Sus morfologías están determinadas por diversos factores, como las fitohormonas, minerales, agua, y suelo (Cutter, 1971; Esau, 1977; Dolan, 1997; Holsinger, 2000), así como la suma de procesos genéticos, bioquímicos, fisiológicos, y morfogenéticos que tienen lugar durante sus diferentes etapas de desarrollo y ontogenia. Sus caracteres físicos (tamaño, forma; disposición y estructura de órganos y tejidos; células y estructuras subcelulares) están ligados de diversas maneras y en diferentes etapas ontogénicas a la naturaleza y eficacia de las actividades funcionales. Un pequeño cambio genético puede transformar a gran escala la estructura de la planta (Wardlaw, 1968; Bierhorst, 1971; Wareing y Phillips, 1978; Alberts, 2002). Las plantas vasculares superiores presentan una gran diversidad en su morfología, que van desde la forma de las hojas y, del fruto hasta la organización de sus estructuras reproductivas, etc. El desarrollo de las plantas tiene una amplia variedad de patrones. La colonización y dominación del medio terrestre es un éxito dado por la manifestación de formas selectivas de desarrollo y de una estrecha coordinación y correlación de procesos estructurales y funcionales. La fisiología de las plantas ha permitido su supervivencia en muchos entornos diferentes (Sattler y Rutishauser, 1997; Alberts, 2002).

1.2 Desarrollo y crecimiento vegetal

Al igual que todos los seres vivos, las plantas cumplen un ciclo vital. Este ciclo vital está constituido por varias etapas importantes en el crecimiento: la embriogénesis, el crecimiento vegetativo y el desarrollo reproductivo.

La embriogénesis es el proceso por el cual una simple célula es transformada en una identidad multicelular. Ciertos grupos de células conocidos como meristemos apicales se establecen en el punto de crecimiento del tallo y la raíz, y mejoran la elaboración de tejidos y órganos adicionales durante el crecimiento vegetativo subsecuente. El crecimiento vegetativo es indeterminado, se caracteriza por repetidos programas de desarrollo de órganos laterales, permitiendo que la planta elabore una arquitectura más adecuada al ambiente local. Después del periodo de crecimiento vegetativo, las plantas responden a una combinación de factores internos y externos, incluyendo tamaño, temperatura y fotoperiodo, que los llevarán a la transición hacia el desarrollo reproductivo (Fosket *et al.*, 2010).

En plantas, la mayoría de los órganos crecen post-embrionicamente, mediante la división y la expansión celular. El crecimiento de las plantas está gobernado por la integración de la división celular que provee nuevas células y la expansión celular, un proceso que aumenta en gran medida el volumen celular una vez que las células han dejado de dividirse. El desarrollo de la planta trae como resultado la formación de nuevos órganos tales como las hojas, tallos, flores, frutos, etc. (Nelissen *et al.*, 2013).

1.3 Desarrollo en plantas vasculares

La arquitectura post-embriónica de una planta es el resultado del funcionamiento de sus meristemos (Tourn *et al.*, 1999; Perreta y Vegetti, 2005). A partir de la división de la célula huevo, la planta vascular produce nuevas células y forma nuevos órganos. Los primeros estadios del desarrollo están caracterizados por la división celular, pero a medida que el embrión aumenta y se transforma en una planta independiente, la adición de nuevas células queda gradualmente restringida a ciertas partes del cuerpo (Esau, 1977; Kenrick, 2000).

Una planta vascular empieza su existencia como un simple cigoto unicelular. El cigoto se transforma en embrión y, finalmente, en el esporófito adulto. Este desarrollo implica la división, el agrandamiento y diferenciación de las células, y una organización celular en complejos más o menos especializados: los *tejidos* y los *sistemas de tejidos*. El embrión de una planta con semillas presenta una estructura relativamente simple comparada con la planta adulta; tiene un número limitado de partes (con frecuencia sólo un eje con uno o más cotiledones) y sus células y tejidos están en su mayor parte poco diferenciados. Sin embargo, el embrión tiene potencialidad para un ulterior crecimiento, debido a la presencia en los dos extremos del eje del meristemo (el *meristemo apical*) del futuro brote y raíz. Durante el desarrollo del brote y de la raíz que sigue a la germinación de la semilla (la semilla representa el órgano principal que preserva la información genética de una planta), la aparición de nuevos meristemas apicales puede determinar la reiterada ramificación de estos órganos. Después de un cierto período de crecimiento vegetativo, la planta entra en el estado reproductivo mediante el desarrollo de estructuras con esporas (Esau, 1977; Basile *et al.*, 2017).

El crecimiento de los órganos de la planta a partir de los meristemas apicales pasa por un período de expansión en anchura y longitud. El crecimiento inicial de las raíces y de los brotes vegetativos y reproductivos formado sucesivamente se conoce con el nombre de *crecimiento primario*. El cuerpo de la planta formado por este crecimiento es el cuerpo primario y está constituido por tejidos primarios. Casi todas las dicotiledóneas presentan un aumento de grosor del tallo y de la raíz mediante un *crecimiento secundario* o también llamado *crecimiento secundario cambial* porque depende de la producción de células por un “cámbium” (meristemo lateral del tejido vascular) (Ewers, 1982; Yang *et al.*, 2016). El *cámbium vascular* produce los tejidos vasculares, los cuáles son importantes para el transporte de agua y nutrientes a través de la planta. Los principales componentes de los tejidos vasculares son el xilema y el floema que se derivan del meristemo vascular del procámbium y cámbium. La formación de dichos tejidos es la causa del aumento de diámetro del tallo y de la raíz (Esau, 1977; Yang *et al.*, 2016).

1.4 Meristemos

El meristemo está definido en un amplio sentido como un tejido independiente en constante proliferación, caracterizado por la presencia de células madre auto-renovables (Esau, 1977; Tsukaya, 2014). El desarrollo de las plantas muestra un grado notable de plasticidad, que en gran medida se puede atribuir a los meristemos. Distintos tipos de meristemos contribuyen al desarrollo vegetativo de las plantas y pueden distinguirse con base en la posición de la planta. El meristemo apical de raíz (RAM) y el meristemo apical del tallo (SAM), se encuentran en la punta de la raíz y del tallo, respectivamente. Los meristemos intercalares representan tejidos en proliferación, mientras que los meristemos marginales tienen una función similar en los bordes de los órganos en desarrollo. Pequeños grupos de células superficiales, son conocidos como meristemoides, los cuales dan lugar a estructuras tales como los tricomas o estomas (Fosket *et al.*, 2010).

En plantas superiores, los nichos de las células del tallo la mayoría proviene del Meristemo apical del tallo (SAM) y del Meristemo apical de la raíz (RAM) (Busch *et al.*, 2010).

Los meristemos primarios son los responsables del crecimiento en longitud de la planta por lo que sus células se dividen anticlinalmente. Dentro de ellos tenemos a los meristemos apicales que se sitúan en el ápice del tallo y de cada rama, y en el ápice de la raíz principal y de cada una de las raíces secundarias. En el primer caso están protegidos por los primordios foliares, mientras que en el segundo por la cofia o caliptra. Estos meristemos se denominan meristemos apicales caulinares y meristemos apicales radicales, respectivamente. A partir de cada meristemo apical se formarán la protodermis, que origina la epidermis, el procámbium, que produce los tejidos conductores primarios (xilema y floema primarios) y el meristemo fundamental, que dará lugar al resto de los tejidos de la planta (Taiz y Zeiger, 2002; Yang *et al.*, 2016).

1.5 Epidermis

El término epidermis designa a la capa de células más externa del cuerpo primario de la planta. Este vocablo deriva de las palabras griegas: *epi*, encima,

y *derma*, piel. Este sistema superficial de células varía en composición, función y origen y, por consiguiente, no es posible una definición precisa basándose en un solo criterio.

La epidermis de la planta es crucial para la supervivencia. Entre sus funciones se encuentran, regular interacciones con el ambiente, servir como barrera, percibir estímulos tal como la luz, controlar el crecimiento de la planta (Amanda *et al.*, 2016). Además de limitar la transpiración, da protección mecánica, permite el intercambio gaseoso a través de los estomas y almacenaje de agua y productos metabólicos, transmite señales a el resto del cuerpo de la planta, secreta enzimas y absorbe nutrientes (Guimil y Dunand, 2007). Algunas funciones accesorias, sin embargo, pueden llegar a predominar hasta tal punto que la epidermis asuma características no típicas de este tejido. Entre esta clase de funciones se incluyen la fotosíntesis, secreción, absorción (distinta del tejido epidérmico de la raíz) y posiblemente también, la percepción de estímulos y asociación con los movimientos de la planta. Las células epidérmicas de las plantas son morfológicamente diversas, difieren en tamaño, forma y función. Su morfología única refleja la función integral que desempeña cada célula en el órgano al que pertenece (Guimil y Dunand, 2007; Amanda *et al.*, 2016).

En general, este tejido es relativamente pasivo en relación a las actividades meristemáticas. No obstante, se sabe que la epidermis reanuda tal actividad durante el curso normal del desarrollo y también después de inferir lesiones a la planta. La morfogénesis de las células epidérmicas implica múltiples procesos celulares que actúan en conjunto para crear formas especializadas (Guimil y Dunand, 2007).

En relación con la multiplicidad de las funciones, la epidermis contiene una gran variedad de tipos de células. En *Arabidopsis* se pueden formar muchos tipos de células epidérmicas especializadas de tamaño, forma y función variable, estas incluyen células del pavimento de hojas de forma irregular, células guarda dinámicas, células de pelos radicales y células de tricomas extremadamente grandes (Guimil y Dunand, 2007). La mayor parte del tejido está formado por las células epidérmicas propiamente dichas, las cuáles pueden ser consideradas como los elementos menos especializados del sistema, y que constituyen la masa fundamental del tejido (Esau, 1977).

1.6 El tallo

A pesar de la diversidad de los tipos de tallos que se han originado por selección natural, todos comparten una organización simple (Mauseth, 1988). El vástago constituye el sistema aéreo de la planta, está formado por el tallo y las hojas a los que luego se les suma los órganos reproductivos. El vástago es más complejo que el ápice radical y puede dar origen a gran variedad de estructuras. En contraste con el radical, el vástago es superficial. Los productos más obvios son las hojas y el tallo de la planta; no obstante, puede formar también yemas axilares y órganos reproductores, previa transformación a ápice floral (Raven, 1992).

El meristemo apical es la fuente de la cual derivan los otros meristemos: protodermis, meristemo fundamental y procámbium. Estos tres meristemos formarán epidermis, tejido fundamental (médula y corteza) y tejido vascular (xilema y floema) (Raven, 1992; Flores-Vindas, 2013).

El tallo como parte integrante del brote, se organiza durante el desarrollo del embrión. Una característica del tallo en estado de desarrollo es su división en nudos y entrenudos, esta división es consecuencia de la manera de originarse las hojas en el ápice del brote y del subsiguiente crecimiento del eje que las soporta. El ápice del brote da origen a los primordios foliares, en tan estrecha sucesión que el brote joven puede considerarse como una serie de discos superpuestos provisto cada uno de ellos, de una hoja o más hojas, según la disposición de éstas en la planta considerada (Esau, 1977; Flores-Vindas, 2013).

Las funciones principales del tallo son las de sostén, transporte de fotosintatos (carbohidratos y otros compuestos que se producen durante la fotosíntesis), transporte de agua y nutrientes, almacenamiento de sustancias alimenticias entre las raíces y las hojas, y formación y mantenimiento de las hojas y estructuras reproductivas. Además, el tallo es la porción de las plantas vasculares que suele llevar hojas y yemas. Generalmente es aéreo, erguido y alargado, aunque en algunas plantas presenta una estructura muy modificada. Los puntos del tallo de donde brotan las hojas y las yemas se llaman nudos, y el espacio comprendido entre dos nudos, entrenudo (Font Quer, 1982).

Los tejidos conductores del interior del tallo se organizan en columnas llamadas haces vasculares. Están formados por xilema, que conduce agua en sentido ascendente, y floema que transporta los azúcares producidos por las hojas en sentido ascendente y descendente. Los haces vasculares se prolongan por las hojas donde reciben el nombre de nervaduras. A medida que el tallo crece en longitud se van incorporando nervaduras al sistema vascular, que constituyen el tejido conductor de las hojas y ramas nuevas. La separación entre los haces vasculares es variable y se debe a la presencia de parénquima interfascicular, que también se conoce como radios medulares (Turner y Sieburth, 2003).

En las dicotiledóneas, los haces se agrupan en un anillo cilíndrico; el resto del tallo está formado por tejido fundamental y suele dividirse en corteza, que está situada en la cara exterior del cilindro vascular, y médula, situada en el interior. Los tallos herbáceos, que carecen de tejido leñoso, adquieren resistencia estructural por otros medios (Font Quer, 1982; Raven, 1992).

1.7 La Hoja

La hoja es el principal órgano involucrado en la percepción de la luz; está especializada para la fotosíntesis, respiración y fotorrespiración. La lámina foliar provee una amplia superficie que facilita la absorción de energía luminosa (cloroplastos) y el intercambio de CO₂, O₂ y vapor de agua (estomas, cutícula) entre los espacios intercelulares y la atmósfera (Flores-Vindas, 2013).

La hoja es un órgano plano lateral del tallo y crece en tres ejes dimensionales: proximal-distal, media-lateral y adaxial-abaxial (Steeves y Sussex, 1989). Está compuesta de diferentes tipos de células incluyendo células de la epidermis, células de empalizada, células del mesófilo esponjoso y células del xilema y floema (Esau, 1977). Tiene crecimiento limitado y constituye una de las partes más importantes de las plantas vasculares, pues en ella se efectúan, principalmente, las funciones de fotosíntesis y transpiración, así como la respiración (Mauseth, 1988; Nicotra *et al.*, 2011; Chitwood *et al.*, 2012). Para adaptarse a diferentes hábitats naturales las plantas han desarrollado una variedad de formas foliares; que van de lo simple a lo compuesto, son selectivamente ventajosas porque proveen protección, soporte, almacenamiento e incluso ayudan a la absorción de nitrógeno. Por ejemplo, las

hojas delgadas planas (óptimas para la intercepción de la luz) tienen una amplia superficie de área a través de la cual pueden perder agua. La estructura de la epidermis de la hoja y del tallo es muy similar. Ambas estructuras consisten en un alto porcentaje de células epidérmicas planas y tabulares ordinarias y tricomas, que pueden ser abundantes (Mauseth, 1988; Agrios, 2005). Las plantas al ser organismos sésiles presentan hojas que exhiben gran variedad de rasgos morfológicos y fisiológicos que les han permitido la adaptación a diferentes hábitats. Por tanto, los rasgos estructurales de la hoja tales como la forma, tamaño y patrones de venación y rasgos fisiológicos están ampliamente diversificados (Flood *et al.*, 2011; Sack *et al.*, 2012; Tsukaya, 2014). Debido a la enorme complejidad celular de las hojas, el entendimiento de los mecanismos de regulación del desarrollo de estos órganos es difícil (Malinowsky, 2013).

1.8 Desarrollo de la hoja

El desarrollo de la hoja se define por una serie de procesos característicos: a) el crecimiento lateral, que resulta en la formación de la lámina; b) la diferenciación gradual, que se da dentro de órganos determinados sin un meristemo persistente; c) patrones de formación, incluyendo el establecimiento dorsoventral en la arquitectura de la hoja; y d) regulación de la distribución de células especializadas, tales como los tricomas o estomas en las células de la epidermis.

En la etapa inicial del crecimiento de la hoja, inmediatamente después de la aparición del primordio de hoja del meristemo apical, todas las células en la hoja se dividen. A medida que pasa el tiempo, las células de la punta de la hoja cesan su división y comienzan a expandirse, mientras que las células de la base aún se dividen (Fournier *et al.*, 2005; González *et al.*, 2012).

Las hojas están bajo una diferenciación gradual para llegar a un tamaño finito y a una forma determinada. Comienzan su desarrollo en el meristemo apical del brote, y, tras el establecimiento dorso-ventral, comienzan a expandirse lateralmente para generar una lámina plana (Efroni *et al.*, 2010). La expansión de la lámina está asociada con la pérdida progresiva del potencial morfogenético en regiones del margen de las hojas llamado “blastozonas

marginales”, las cuales generan la lámina y la forma lateral de la misma (e.g., serraciones) (Hagemann y Gleissberg, 1996). Estos aspectos de la maduración de la hoja están correlacionados con los cambios prolongados en la expresión de genes (Efroni *et al.*, 2008). La relación entre los cambios graduales de la expresión de genes y la pérdida progresiva del potencial morfogénético aún no se entiende en su totalidad (Malinowsky, 2013).

En *Arabidopsis* tanto la división como la expansión celular influyen en el tamaño final de la hoja y están dirigidos por diferentes vías moleculares (González *et al.*, 2012).

1.9 Factores que influyen en la forma y tamaño final de la hoja

El tamaño de los órganos es un atributo fundamental de los organismos multicelulares (Mizukami y Fisher, 2000; Mizukami, 2001; Hu *et al.*, 2003) además de ser un importante parámetro en la caracterización de la morfología y función de los mismos (Malinowski, 2013). Los mecanismos que controlan el tamaño de los órganos en la planta son, en ocasiones, complejos, debido a factores como la capacidad de adaptarse a los cambios en el ambiente (plasticidad fenotípica). Estas variaciones en el ambiente incluyen cambios en la luz, temperatura y estatus de los nutrientes (Kozuka *et al.*, 2005). Entre los órganos de las plantas, las hojas ocupan una posición única en el control del tamaño del órgano. Ellas constituyen la mayor parte aérea de la planta y derivan de un crecimiento determinado. En contraste con los tallos y raíces que tienen un crecimiento indeterminado (Tsukaya, 2002).

El tamaño de las hojas y su forma están definidos tanto por el tamaño, como por el número de sus células. Las condiciones ambientales también influyen en el tamaño y forma final de las hojas (Malinowski, 2013; Vanhaeren, 2016). La forma final de la hoja es el resultado de una interacción entre la tasa de crecimiento y la orientación del crecimiento. La regulación de las actividades meristemáticas también afectan la forma final de la hoja, mientras que el tamaño final está determinado por la multiplicación del número de células y el tamaño promedio de la célula y está bajo control genético (Johnson y Lenhard, 2011). La transición de la proliferación celular a la expansión celular es crítica para determinar el tamaño de la hoja (Malinowski, 2013).

Las bases genéticas son evidentes para la uniformidad del tamaño de la hoja y su forma dentro de un genotipo dado, y por contraste hay una gran variación en el tamaño de la hoja entre diferentes genotipos, incluso cuando las plantas crecen bajo las mismas condiciones (Johnson y Lenhard, 2011).

Los estudios interdisciplinarios muestran que los patrones de crecimiento global influyen la forma final de la hoja generada por la acción cooperativa de salidas genéticas, bioquímicas y biomoleculares (Malinowski, 2013).

Cambios en las propiedades mecánicas de células particulares y tejidos, ocurren a través de la vida de una planta y son necesarios para la adaptación al ambiente. Todas las células de la planta están conectadas, trabajan juntas y a la vez por separado, sin embargo, sus cambios en propiedades biofísicas pueden afectar significativamente al órgano entero (Malinowski, 2013).

Las hojas están primariamente compuestas por una capa externa de las células de la epidermis, numerosas capas de diferentes tipos de células del parénquima y tejidos conductores. Los tres principales tejidos (epidermis, parénquima y tejidos constitutivos) tienen diferente dinámica de crecimiento y rigidez (Horiguchi *et al.*, 2006).

Tanto el desarrollo de la hoja, del tallo, de la flor o del fruto, están mediados por la expresión diferencial de genes en la planta. Esta expresión diferencial de genes es responsable de las variaciones en la química, comportamiento, y estructura al interior de los grupos de células. Gracias a este proceso una plántula en desarrollo con un solo tipo de células puede llegar a ser una planta completa con miles de células. La expresión diferencial de genes en la mayoría de los casos está regulada por Factores de Transcripción (FTs).

2. ANTECEDENTES

2.1 Factores de transcripción

Los Factores de Transcripción regulan el desarrollo celular, la diferenciación y el crecimiento celular debido a la unión de sitios específicos al ADN, y regulan la expresión diferencial de los genes (Pabo y Sauer, 1992). Los FTs se unen a una secuencia promotora de ADN cerca del sitio de transcripción y ayudan a formar el complejo de iniciación de la transcripción. La regulación de la transcripción es la forma más común de control de la expresión genética. Cerca del 10% de genes de plantas superiores codifican para FTs. Los FTs son esenciales en la regulación del desarrollo de las plantas, la reproducción, señalización intercelular, respuesta a condiciones ambientales, ciclo celular y metabolismo (Yuan y Perry, 2011).

Los estudios en las estructuras de los FTs, así como de la comparación de sus secuencias, permite agrupar dentro de diversas clases a estas proteínas. Algunas familias tales como las proteínas hélice-giro-hélice (HTH), fueron reconocidas por primera vez, debido a su similaridad estructural. Otras familias fueron identificadas por la comparación de sus secuencias y después caracterizadas por estudios estructurales. Se conoce un amplio número de familias entre las que se encuentran: 1) las proteínas hélice-giro-hélice, 2) los homeodominios, 3) las proteínas tipo dedos de zinc, 4) los receptores de esteroides, 5) las proteínas zipper de leucina, y 6) las proteínas hélice-bucle-hélice (Pabo y Sauer, 1992). A pesar de la importancia de los FTs y la rápida expansión en el número de genes que codifican para Fts (descubiertos a través de genómica y bioinformática), sólo algunos FTs han sido sometidos a una extensa caracterización funcional. Un desafío monumental frente a la biología molecular de las plantas, es entender los mecanismos de función de los FTs. Esta tarea es particularmente desafiante, considerando que los FTs pueden unirse a diferentes elementos *cis*, variando afinidades y, a menudo, funcionando de una manera combinatoria con otros factores de regulación (Yuan y Perry, 2011).

2.2 Factores de transcripción con dedos de zinc

Los Dedos de Zinc (ZFs, por sus siglas en inglés) son algunos de los motivos más comunes de las proteínas de los eucariotes. Se clasifican de acuerdo al número y al orden de sus residuos de cisteína e histidina, los cuáles coordinan a un ion zinc para mantener la estructura terciaria característica (Wolfe *et al.*, 2000). Los dedos de zinc están involucrados en diversos procesos biológicos incluyendo la modificación de la cromatina y la regulación transcripcional (Laity *et al.*, 2001; Englbrecht *et al.*, 2004) La familia A1 de proteínas de dedos de zinc en plantas pertenece a la minoría de proteínas con arreglo en tándem y se caracteriza por tener cuatro dedos de zinc. El subgrupo A1d de esta familia tiene seis miembros en *Arabidopsis thaliana* (*WIP1*, *WIP2*, *WIP3*, *WIP4*, *WIP5* y *WIP6*) los cuales tienen sus dedos de zinc altamente conservados en la región C-terminal, llamado dominio WIP, de acuerdo a sus tres aminoácidos iniciales, Triptófano, Isoleucina y Prolina (Sagasser *et al.*, 2002) (Figura 1).

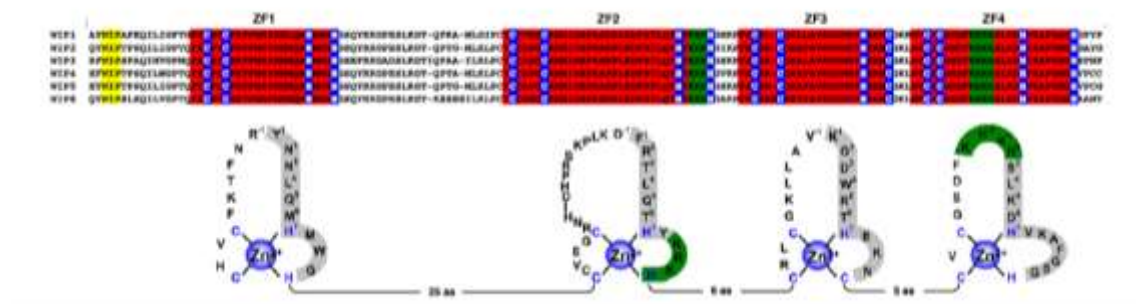


Figura 1. Alineamiento de aminoácidos del dominio WIP de los seis miembros de esta familia de factores de transcripción y la estructura representativa de uno de ellos (Appelhaagen *et al.*, 2010).

2.3 WIP en plantas

Los genes *WIP* en principio se han encontrado en todos los genomas de plantas disponibles, por lo que se deduce que están en todas las plantas embriofitas. Sin embargo, el número de genes difieren. Por ejemplo, en *Marchantia polymorpha*, una planta no vascular, tiene un sólo representante

WIP que tiene homología con las proteínas *WIP* de *Arabidopsis thaliana* (Andrade, 2015).

Los *WIPs* han sido estudiados funcionalmente solamente en *Arabidopsis* y *Cucumis melo*. En esta última planta se ha reportado que la expresión del gen *CmWIP1* conduce al aborto del carpelo, produciendo flores masculinas, mientras que las plantas que producen sólo flores femeninas o hermafroditas son resultado de modificaciones epigenéticas en el promotor del gen *CmWIP1* (Martin *et al.*, 2009).

2.4 *WIP* en *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana tiene seis miembros de la familia *WIP* (*WIP1*, *WIP2*, *WIP3*, *WIP4*, *WIP5* y *WIP6*). Se han caracterizado y descrito fenotipos alterados de mutantes sencillas para tres de ellos (*WIP1*, *WIP2* y *WIP6*), como se describe a continuación.

2.5 *WIP1*

En *Arabidopsis thaliana* *TT1/WIP1* (*TRANSPARENT TESTA 1*) se expresa específicamente en las células del endotelio durante el desarrollo de la semilla. La pérdida de función causa un color amarillo en la semilla comparado con la semilla de la planta silvestre, por lo que recibe el nombre de *transparent testa* (*tt1*). Las semillas de esta mutantes son amarillas debido a la carencia de proantocianidinas (PAs) (Sagasser, 2002) (Figura 2D).

2.6 *WIP6*

WIP6, también conocido como *DOT5* (*DEFECTIVELY ORGANIZED TRIBUTARIES 5*) presenta alteraciones en el patrón de venación de las hojas, además de retraso en el inicio de la formación de hojas y raíces, desarrollo anormal en los peciolo, en ocasiones la filotaxia también esta alterada. Se sugiere que *DOT5* es requerido para el desarrollo normal del tallo y raíz (Petricka, 2008) (Figura 2B).

2.7 *WIP2*

De los miembros caracterizados, el miembro al cual se le han descrito más de una función y en más de un órgano de la planta es *WIP2*.

WIP2 juega un rol importante en el desarrollo del tracto de transmisión del pistilo, el cual es importante para el crecimiento de los tubos polínicos del estigma hacia los óvulos, y por esto también es referido como *NO TRANSMITING TRACT (NTT)* (Figura 2A). Además del tracto de transmisión, también se expresa en otros tejidos, como los meristemos de raíz (Crawford *et al.*, 2015). En estudios enfocados en el fruto de *Arabidopsis thaliana*, se ha observado que el promotor *WIP2* es activo durante el desarrollo del replum y que la sobreexpresión de este gen incrementa el tamaño del tejido. Mientras que mutantes con pérdida de función tienen el efecto contrario con una reducción en el número de filas de células (Marsch-Martínez *et al.*, 2014).

Se conoce que la identidad del replum, así como la de las valvas y sus márgenes, está dada por la mutua represión de genes. La actividad de los genes que dirigen el desarrollo de los márgenes de la valva tienen que regularse y limitarse solo a esta zona. *FUL (FRUITFULL)* evita que las acciones de los genes del margen se extiendan hacia las valvas y *RPL (REPLUMLESS)* hace lo mismo, pero en el replum. La sobreexpresión de *WIP2* en plantas sobreexpresantes de *FUL*, provocan que el replum y en menor grado los márgenes de la valva se formen. Por lo cual se sugiere que la interacción *WIP2-FUL* contribuye en el proceso de represión entre genes que provocan la correcta diferenciación de esta región del fruto. Aunque también la acción directa de *WIP2* en el desarrollo del replum podría deberse a la interacción de otras proteínas involucradas como *RPL*. Además, en ensayos de proteína-proteína se demostró que *WIP2* es capaz de interactuar con otras proteínas importantes para el desarrollo del fruto y algunas para el desarrollo del meristemo apical como son: *RPL*, *FUL*, *STM (SHOOTMERISTEMLESS)* y *SHP1* y *SHP2 (SHATTERPROOF)* (Roeder *et al.*, 2003; Marsch-Martínez *et al.*, 2014).

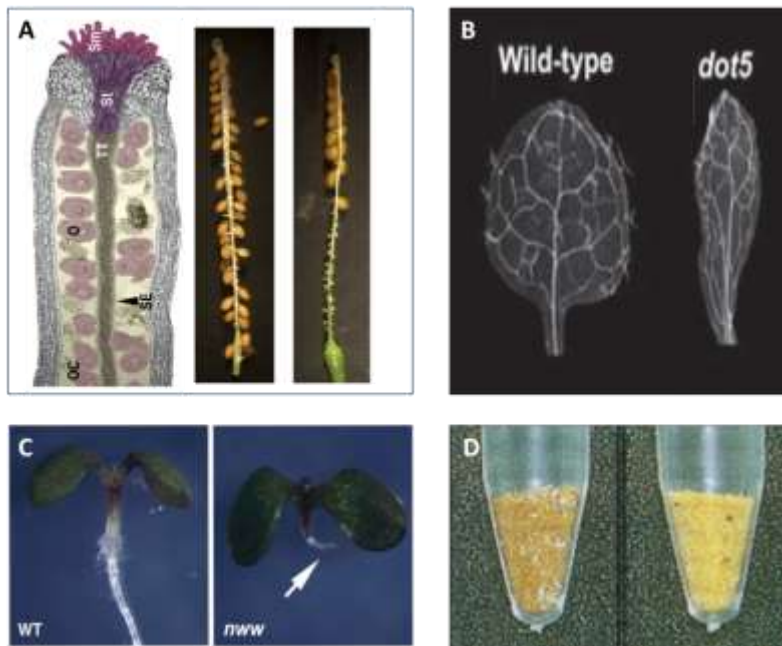


Figura 2. Fenotipos de las diferentes mutantes *wip* (mutantes sencillas y triple). (A) *wip2* (Crawford *et al.*, 2007); (B) *wip6* (Petricka *et al.*, 2008); (C) *nww* (*wip2 wip4 wip5*), Crawford *et al.*, 2015); (D) *wip1* (Sagasser *et al.*, 2002).

2.8 Patrón de expresión de *pWIP2::GUS*

En el laboratorio de Identidad Celular se ha observado que *WIP2*, no sólo se expresa en los tejidos y estadios de crecimiento anteriormente mencionados. Ramos (2013) realizó observaciones de las fusiones transcripcionales de la línea marcadora *pWIP2::GUS*, en plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 9 a 12 días después de la germinación (ddg). Observó que la transcripción de este gen es activa en células del meristemo apical, principalmente en la zona medular y en la vasculatura de hojas jóvenes (Ramos, 2013) (Figura 3). Sin embargo, a pesar de que la expresión en estos tejidos fue clara, los fenotipos en las mutantes sencillas *wip2* aún no mostraron alteraciones evidentes. Debido a esto se sugiere que en esta familia de factores de transcripción podría existir redundancia de función. Teniendo en cuenta esto, se han realizado investigaciones con múltiples mutantes de esta familia de genes (*wip2 wip3*, *wip2 wip5* y *wip2 wip3 wip5*).

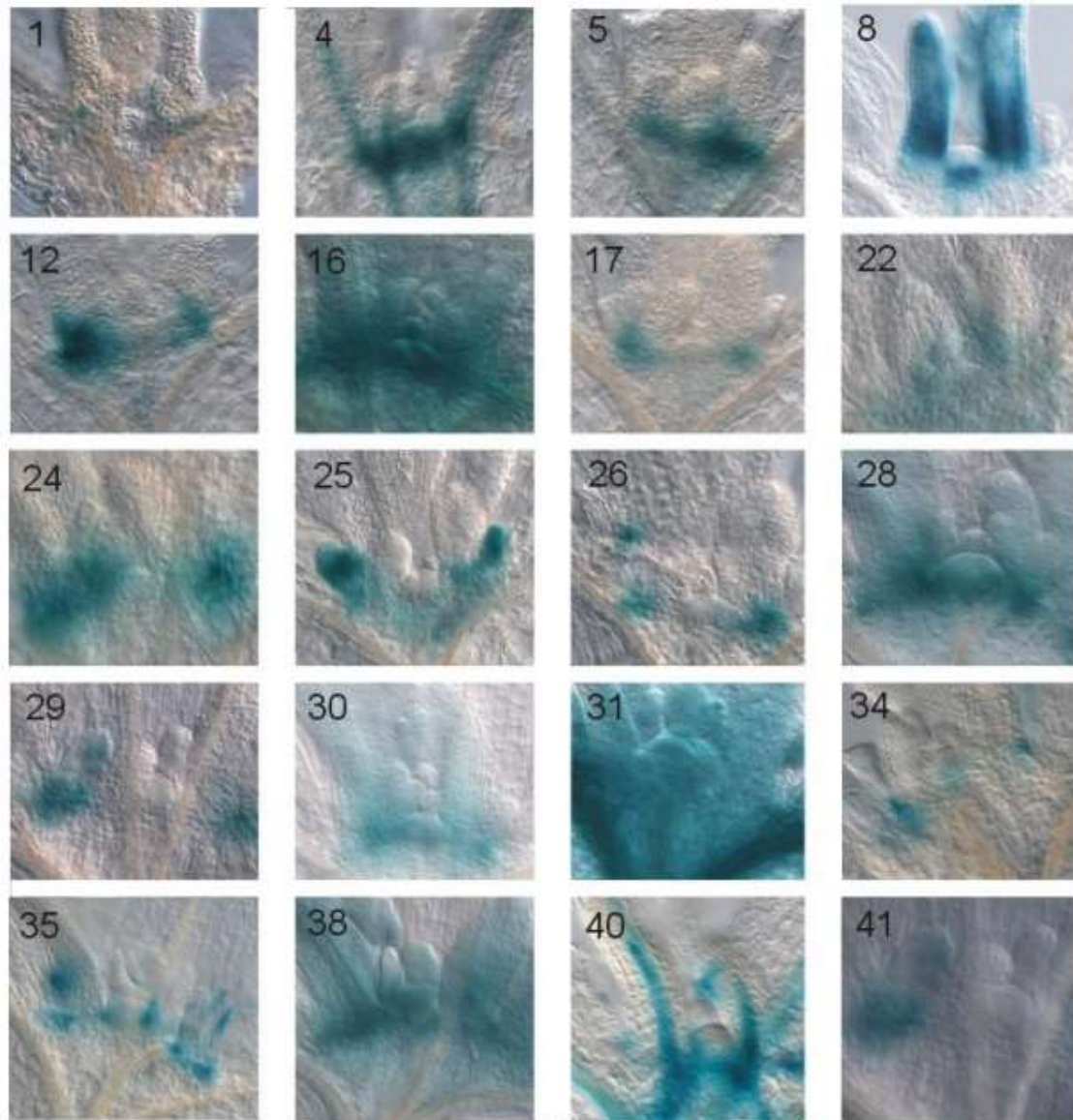


Figura 3. Patrón de expresión de *WIP2* en el meristemo apical del tallo durante etapas tempranas del desarrollo de la plántula. Análisis del patrón de expresión dirigido por el promotor de *WIP2* en 20 líneas independientes con la construcción *WIP2:GUS*. (Ramos, 2013).

2.9 *wip3*, *wip2 wip3*

En estudios previos, en el laboratorio se observó que la mutante sencilla *wip3* tenía un retraso en el tiempo de floración (Díaz, 2015; Figura 4C). Debido a que no se realizaron cuantificaciones directas, es necesario realizar un análisis más riguroso para validarlo por completo. Por otro lado, en el Laboratorio de Genómica Funcional del Desarrollo de Plantas evaluando el tiempo de floración en diferentes mutantes se observó que la doble mutante *wip2 wip3* no difería

con respecto a la Wt en número de días que transcurrían para su floración, pero sí en el número de hojas que había en la planta al ocurrir la floración.

2.10 *wip2*, *wip2 wip5*

De la misma forma, en experimentos previos, en el Laboratorio de Identidad Celular al estudiar a la doble mutante *wip2 wip5*, se observó que estas plantas comparadas con la planta silvestre, presentaban una roseta más grande (Díaz, 2015) (Figura 4A y 4B). Esto sugirió que *wip2* y *wip5* podrían estar participando en la determinación del tamaño de la hoja de la roseta. En este mismo estudio, se concluyó que estos genes presentan redundancia de funciones en silicua, además de participar en la formación de raíces secundarias y en la determinación del patrón de lignificación en tallo (Díaz, 2015). Con la evidente diferencia de tamaño en *wip2 wip5* respecto al Wt, surgió la pregunta: ¿A qué se debe esta diferencia de tamaño? Para responder la cuestión se tienen dos posibles respuestas: a) la hoja de *wip2 wip5* es más grande porque tiene un mayor número de células o b) la hoja de *wip2 wip5* es mayor porque sus células son más grandes. El contestar esta interrogante permitirá obtener conocimiento sobre la función de estos genes, y del control del tamaño de órganos en plantas.

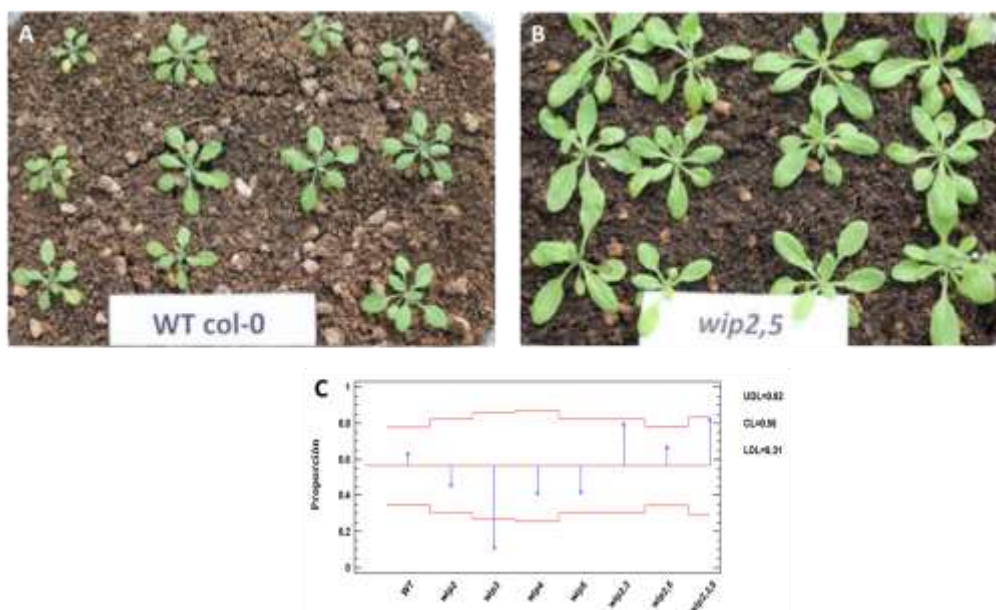


Figura 4. Observaciones previas de fenotipos alterados de *wip2 wip5* y *wip3* en el laboratorio de Identidad Celular. (A) Roseta de planta silvestre Ecotipo Columbia 0. (B) Roseta de doble mutante *wip2 wip5*. (C) Gráfica ANOM de número de plantas de diferentes

genotipos floreciendo a 40 días en promedio, *wip3* es estadísticamente diferente con respecto a los demás (Díaz, 2015).

2.11 *wip2 wip4 wip5 (nww)*

Las investigaciones previas en el laboratorio demuestran que, para conocer la función de esta familia de genes, no es suficiente el estudio con mutantes sencillas, sino que es necesario utilizar dobles e incluso triples mutantes. Lo anterior se refuerza con el trabajo publicado por el grupo de Crawford y colaboradores en el año 2015, quienes observaron que entre *WIP2*, *WIP4* y *WIP5* existe una redundancia de funciones. Las plantas carentes de un gen o dos genes tenían un crecimiento de raíces normales. Sin embargo, la pérdida de función simultánea de estos tres genes (*WIP2*, *WIP4* y *WIP5*, mutante *nww*) provoca que no se desarrollen raíces (Figura 2C). Concluyendo que la presencia de los tres genes es requerida para la formación de la raíz y que estos tres genes de manera individual pueden cumplir con la función (Crawford *et al.*, 2015).

Estas observaciones son de gran importancia para el presente trabajo, plantean la posibilidad de funciones muy relevantes para *WIP2* en algunos tejidos. Por ejemplo, en la raíz, donde es esencial junto con *WIP4* y *WIP5*, o como en *CmWIP1* en melón, donde su cambio en expresión provoca un cambio radical en el sexo de las flores. Además, permite el planteamiento de preguntas como: ¿En qué otros tejidos y en que otros estadios de desarrollo de *Arabidopsis thaliana* está involucrado *WIP2* y cuál es la relevancia de su expresión?

2.12 Estudios previos sobre la morfología y el tamaño de la hoja

En el grupo de trabajo, se ha observado un incremento en el tamaño de la roseta en la doble mutante *wip2 wip5* (Díaz, 2015). Sin embargo, aún no se conocen las causas de dicho fenotipo. Por lo cual es necesario conocer la razón de dicho tamaño y conocer el papel que estos genes pueden tener en el control del tamaño de un órgano. Los complejos mecanismos que regulan tanto la forma como el tamaño final de la hoja han sido objeto de numerosos

estudios, y el comprender estos mecanismos ayuda a entender el desarrollo de este órgano que cumple una función muy importante en la planta. Se ha visto que los múltiples mecanismos involucrados en coordinación local y global dentro de la epidermis son cruciales para la forma final de la hoja (Malinowski, 2013).

Las plantas superiores han desarrollado una amplia variedad de formas de hoja que difieren en tamaño y forma. Se ha especulado mucho acerca de cómo la forma de la hoja contribuye a la estrategia de vida de la planta. Entender los mecanismos involucrados en el control del tamaño de las hojas es un reto, pues en el tamaño final están involucrados tanto mecanismos complejos como estímulos tanto internos como externos (Malinowski, 2013).

Horiguchi y colaboradores (2006), realizaron un estudio con un grupo de mutantes, entre los cuales están *angustifolia3/grf-interacting factor 1* y *aintegumenta*. Dichas mutantes exhibían un intrigante fenotipo celular llamado “compensación”, el cual consistía en que cuando el número de células de la hoja disminuye debido a la mutación, el tamaño de la célula incrementa conduciendo a la compensación en el área de la hoja. Evidencia genética sugería que la compensación probablemente no era resultado del desacoplamiento de la división celular al crecimiento celular. La evidencia sugería un mecanismo en todo el organismo que coordina la proliferación celular con la expansión celular durante el desarrollo de la hoja (Horiguchi *et al.*, 2006).

Son diversos los genes, así como las familias de factores de transcripción que están involucrados en el tamaño y la forma final de la arquitectura de la hoja. Por ejemplo, las plantas que sobre-expresan a los factores de transcripción *AINTEGUMENTA (ANT)*, *GROWTH REGULATING FACTORS5 (GRF5)* y *ANGUSTIFOLIA3/GRF-INTERACTIVE FACTOR 1 (AN3/GIF1)*, presentan hojas más largas comparadas con plantas Wt debido a un incremento en el número de sus células, pero no a un incremento en el tamaño de sus células (Mizukami y Fisher, 2000; Kim y Kende, 2004; Horiguchi *et al.*, 2005). Contrariamente la expansión celular en hojas, pero no la proliferación celular es específicamente activada por la sobreexpresión de *AtGRF1* y *AtGRF2* (Kim *et al.*, 2003).

Savaldi-Goldstein y colaboradores en 2013, realizando un trabajo con la mutante *bri1*, mostraron que la expresión de *BRI1* en la epidermis de un fondo genético mutante de *bri1* fue suficiente para restaurar el tamaño de la hoja. Además, demostraron que el crecimiento epidérmico es el mayor factor responsable de la expansión de la lámina (Fridman y Savaldi-Goldstein 2013). La epidermis tiene un alto impacto en el crecimiento de la hoja y la forma que adquiere al final; por tanto, es muy importante para entender los mecanismos reguladores de la dinámica celular dentro de estos tejidos. Dentro de la epidermis, podemos distinguir células del pavimento, células guarda, células del meristemo, tricomas y células marginales. La diferenciación de estas células está regulada por vías especializadas que influyen en la reorganización de los microtúbulos, endoreduplicación y síntesis o modificación diferencial de la pared celular (Dong *et al.*, 2010). Las hormonas vegetales tales como las auxinas y las citocininas tienen un rol importante en mantener la actividad meristemática durante fases tempranas del desarrollo del primordio de la hoja (Donnelly *et al.*, 2009).

3. HIPÓTESIS

Los Factores de Transcripción *WIP* están involucrados en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*: modulan el tiempo de floración, determinan el tamaño final de la hoja de la roseta y participan en la organización de la arquitectura de los haces vasculares del tallo.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo General

Caracterizar en detalle los fenotipos morfológicos observados de mutantes *wip* de *Arabidopsis thaliana*.

4.2 Objetivos Particulares

4.2.1 Evaluar y comparar el tiempo de floración de las mutantes *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3* y *wip2 wip5* con respecto a la planta silvestre (Wt) en dos estaciones del año contrastantes.

4.2.2 Evaluar y comparar el tamaño de las hojas de la roseta, el tamaño y número de células de la epidermis en las mutantes *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3* y *wip2 wip5* con respecto a la planta silvestre (Wt) a los 30 y 60 ddg.

4.2.3 Evaluar y comparar los tejidos internos del tallo en *wip2*, *wip5* y *wip2 wip5* con respecto a la planta silvestre (Wt).

4.2.4 Explorar el patrón de expresión de la línea marcadora *pWIP2::GUS*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Genotipos, condiciones de crecimiento y manejo de material biológico

Para el presente estudio se utilizaron plantas Wt de *Arabidopsis thaliana*, así como mutantes sencillas de *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, y dobles mutantes *wip2 wip3* y *wip2 wip5* (todas en el ecotipo Col0) (tabla 1).

Las semillas fueron sembradas en charolas con sustrato compuesto por *Sunshine Mix* (mezcla 3), perlita y vermiculita 3:1:1 (mezcla para *Arabidopsis thaliana*). Las semillas se sembraron y se colocaron en el cuarto frío a 4° C de tres a cuatro días, pasado este tiempo se llevaron a la cámara de crecimiento, ahí permanecieron tres días, posteriormente se llevaron al invernadero donde crecieron en condiciones de luz natural a una temperatura entre 22°-28° °C y fertilizadas cada 15 días con fertilizante comercial (*MiracleGro* The Scotts Company LLC).

Se utilizaron los siguientes genotipos de *Arabidopsis thaliana*:

	Ecotipo	Línea	Gene ID	Alelo	Mutación
Wild type (Wt)	Columbia 0	Silvestre	---		
<i>wip2</i>	Columbia 0	†SM_3_16705	AT3G57670	<i>ntt-3</i>	Knock out
<i>wip3</i>	Columbia 0	*SALK_072471	AT1G08290		Knock out
<i>wip4</i>	Columbia 0	^gabi_176E02	AT3G20880		Knock out
<i>wip5</i>	Columbia 0	*SALK_114838	AT1G51220		Knock out
<i>wip2 wip3</i>	Columbia 0	*SALK_007406C, *SALK_072471	AT3G57670, AT1G08290	<i>ntt-2</i>	Knock out
<i>wip2 wip5</i>	Columbia 0	†SM_3_16705 *SALK_114838	AT3G57670, AT1G51220	<i>ntt-3</i>	Knock out

Tabla 1. **Genotipos empleados para evaluar los efectos fenotípicos de la pérdida de función** (*Alonso et al, 2003, ^Kleinboelting et al, 2012, †Tiesser et al, 1999).

5.2 Evaluación del tiempo de floración

En plantas silvestres, existe una buena correlación entre el número de días para florecer y el número de hojas que se producen bajo ciertas condiciones, por tanto, el tiempo de floración también puede definirse en términos del

número de hojas (Koornneef *et al.*, 1991). En este estudio se evaluaron tanto el número de días transcurridos desde la germinación hasta la aparición de los capullos de la inflorescencia (ddgf), y el número de hojas en la roseta cuando los capullos de la inflorescencia eran visibles en el ápice (nhf).

Para ello se sembraron plantas de los siete genotipos, dos charolas planas por genotipo, 12 plantas en cada charola, por tanto, el número de muestra para cada genotipo fue de 24 plantas. Las plantas fueron crecidas en invernadero. La evaluación se realizó en dos estaciones el primer muestreo se llevó a cabo en otoño (septiembre-octubre) del 2015, en este primer muestreo fueron evaluados cuatro genotipos: *Wt*, *wip2*, *wip3* y *wip2 wip3*. El segundo muestreo se realizó en primavera (abril-mayo) del 2016. Para este segundo muestreo, se analizaron los mismos genotipos del primer muestreo (*wip2*, *wip3*, *wip2 wip3*) y se agregaron *wip4 wip5*, *wip2 wip5*, todos comparados con las plantas *Wt*. En ambos muestreos se registró el ddgf (Figura 5A), así como el nhf en cada planta. Una vez obtenidos los datos de todos los genotipos, se analizaron los resultados por medio de pruebas estadísticas: Kruskal-Wallis para saber si existían diferencias entre ellos y Stepwise-Stepdown para saber que genotipo era el diferente.

5.3 Evaluación del tamaño de las hojas de la roseta

La evaluación se realizó utilizando los genotipos *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3*, *wip2 wip5* y *Wt*. Se analizó en dos tiempos de desarrollo: a los 30 días después de la germinación (30 ddg) y a los 60 días después de la germinación (60 ddg) (misma planta-diferente tiempo). Para ello se asignaron números a las hojas de la roseta de *Arabidopsis thaliana* (Figura 5B), de manera descendente, la hoja número uno fue la más reciente y así sucesivamente. La hoja seleccionada era la del mismo número en todas las muestras en cada uno de los dos análisis. Para los 30 ddg se utilizó la hoja número 8 y para los 60 ddg se utilizó la hoja número 10. La hoja se cortó y se colocó en fresco en el microscopio digital KEYENCE VHX 5000. El área de la hoja se obtuvo utilizando el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>, Rasband, 2014) y los resultados obtenidos se analizaron por medio de una prueba estadística de ANOVA para saber si existían diferencias significativas, si era así entonces se

procedió a realizar una prueba de comparación de medias LSD (Least Significant Difference) para saber cuál era la muestra diferente.

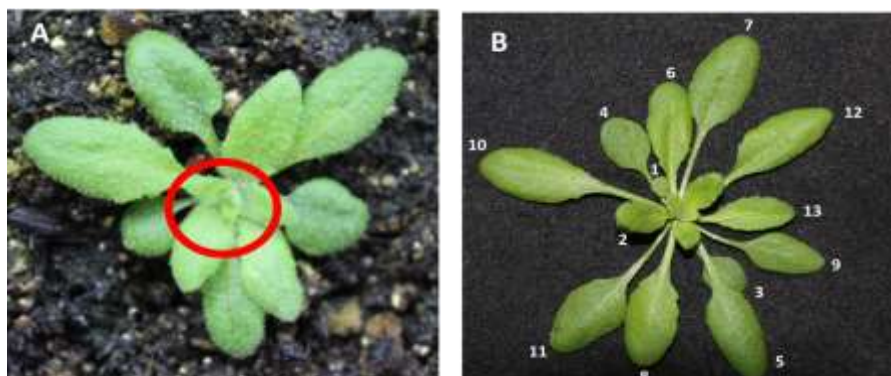


Figura 5. **Rosetas de *Arabidopsis thaliana*.** (A) Roseta de *Arabidopsis thaliana*, el círculo rojo destaca los capullos de la inflorescencia que comienzan a emerger. (B) Roseta de *Arabidopsis thaliana*, los números mayores corresponden a las hojas que aparecieron primero y los menores a las que aparecieron después.

5.4 Evaluación del área de las células de la epidermis de la hoja de la roseta

El proceso de evaluación fue similar al apartado 5.3, en ambos tiempos. Al colocarse la hoja en el microscopio se obtuvieron dos micrografías, una del lado derecho y la otra del lado izquierdo de la vena media de la hoja para cada genotipo, se muestrearon 10 hojas por genotipo. El área de las células de la epidermis de la hoja se obtuvo utilizando el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>, Rasband, 2014). Para ello se contaron el número de células en la micrografía y se dividió entre el área total de la micrografía. Una vez obtenidos todos los datos se analizaron los resultados con una prueba de ANOVA para saber si existían diferencias entre los grupos, si era así se realizó un análisis de LSD para saber cuál era la muestra diferente entre los grupos.

5.5 Evaluación del número de células en la epidermis de la hoja de la roseta

Se evaluó el número de células en la hoja de la roseta de *Arabidopsis* de los genotipos *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3*, *wip2 wip5* y Wt a diferentes tiempos (30 y 60 ddg), para ello se utilizaron los datos del área de las hojas de la roseta y los datos del área de células de la epidermis de la hoja. El número de células por hoja es el resultado de la división del área de la hoja completa entre el área de las células contenidas en una micrografía, por el número promedio de células en la micrografía. Los resultados obtenidos se analizaron por medio de una prueba estadística de ANOVA, así como una prueba de LSD.

5.6 Análisis histológico de tallos de Wt, *wip2*, *wip5*, *wip2 wip5*

En estudios previos en el grupo de trabajo (Díaz, 2015), se observó que el patrón de lignificación en la doble mutante *wip2 wip5*, era distinto comparado con la Wt. Información interesante de explorar, para conocer si estos genes tienen alguna función en estas estructuras. Sin embargo, el tamaño de muestra para este análisis en esa ocasión fue pequeño. Por lo cual en este trabajo se planteó volver a realizar el análisis con un número de muestra mayor. Así mismo definir la forma de evaluar dichos resultados. Para ello se realizó un análisis histológico de cortes transversales de tallo de plantas de *Arabidopsis*. Se utilizaron las mutantes sencillas *wip2*, *wip5* y la doble mutante *wip2 wip5* y la Wt como control. Los tallos de las plantas fueron colectados cuando tenían 20 cm de altura. Para el análisis se hicieron cortes transversales de la parte basal de los tallos en un rango de 2 a 4 cm. Posteriormente los cortes fueron colocados en tubos eppendorf y teñidos con floroglucinol (2% v/v, en alcohol al 95%), por dos minutos, después fueron lavados con ácido clorhídrico, HCl, al 50% (v/v). Las muestras se colocaron en portaobjetos y se cubrieron con un cubreobjetos, los bordes del portaobjetos se limpiaron cuidadosamente para evitar que el ácido dañara el microscopio (Weigel y Glazebrook, 2002). Los cortes transversales de tallos ya teñidos se examinaron inmediatamente en el microscopio estereoscópico Carl Zeiss modelo Stemi 2000-C, puesto que la tinción sólo dura 30 minutos. Las fotos se

tomaron desde la cámara acoplada al estereoscopio Axiocam ERc5s y por medio del software ImageJ se obtuvo el diámetro de los cortes transversales de tallos, además se contaron el número de haces vasculares que presentaba cada tallo en la micrografía. Los datos obtenidos fueron analizados por medio de una prueba de ANOVA.

5.7 Evaluación del patrón de expresión de *WIP2* mediante el gen reportero GUS

Para analizar la expresión de *WIP2* en *Arabidopsis*, se utilizaron plántulas de *WIP2* fusionadas al gen reportero GUS, de plantas de 9 y 40 ddg. Las muestras fueron colocadas en tubos eppendorf a los cuales se les agregó 1000 µl de la solución de GUS (Tabla 2). La enzima β-glucuronidasa (GUS), X-Gluc, el ferrocianuro de potasio y el ferricianuro de potasio, estuvieron presentes en la mezcla de reacción (Stomp, 1992). Las muestras se cubrieron para evitar la evaporación y fueron incubadas a 37° C durante 24 h, posteriormente los tallos fueron clareados mediante lavados continuos con etanol a diferentes concentraciones, para que de esta manera se pudiera observar la tinción azul.

Compuestos	Cantidad en µl	Concentración	
Buffer de fosfato de sodio pH 7.0	1 M	100	100 mM
EDTA pH 8.0	0.25 M	40	10 mM
K ₄ Fe(CN) ₆ 3H ₂ O	5 mM	100	0.5 mM
K ₃ Fe(CN) ₆ 3H ₂ O	5 mM	100	0.5 mM
Tritón	10 %	10	0.1%
X-gluc	40 mM	50	2 mM
Agua destilada		600	
Total	Σ	1000	

Tabla 2. Reactivos utilizados para realizar la reacción GUS/Ferri-Ferro (Stomp, 1992).

5.8 Análisis Estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statgraphics Centurion XVI y SPSS.

6. RESULTADOS

6.1 Evaluación del tiempo de floración: a) Número de días transcurridos desde la germinación hasta la aparición de los capullos de la inflorescencia (ddgf) y b) Número de hojas en la roseta cuando los capullos de la inflorescencia son visibles en el ápice (nhf)

Para evaluar el tiempo de floración se utilizaron dos parámetros, el número de días transcurridos desde la germinación hasta la aparición de capullos de la inflorescencia (ddgf) y el número de hojas en la roseta cuando los capullos de la inflorescencia son visibles en el ápice (nhf). Se analizaron los genotipos *wip2*, *wip3*, *wip2 wip3* y *Wt*, en otoño (septiembre-octubre) del 2015; y se incluyeron los genotipos *wip4*, *wip5*, *wip2 wip5* y *Wt*, en primavera (abril-mayo) del 2016.

6.1.1 Evaluación del ddgf en mutantes sencillas *wip2*, *wip3*, y doble mutante *wip2 wip3* en otoño

En estudios previos en el Laboratorio de Identidad Celular (Ramos, 2013; Díaz, 2015) se observó que la mutante sencilla *wip3* tenía un retraso en el tiempo de floración con respecto al genotipo silvestre. La observación fue indirecta, por lo que en este estudio se decidió realizar el análisis de manera dirigida.

Para corroborar datos anteriormente reportados se analizaron genotipos de *wip2*, *wip3*, *wip2 wip3* y *Wt*, en otoño del 2015. Se contabilizó el ddgf para cada genotipo. Una vez que se obtuvieron todos los datos se realizó una prueba estadística de Kruskal-Wallis, para saber si las medianas de estos grupos diferían. La prueba indicó que hay diferencias estadísticamente significativas (Pvalue=0.000025914) entre el ddgf de los cuatro genotipos analizados. Una vez que se conoció que el ddgf difiere, se realizó la prueba estadística Stepwise-Stepdown, para saber qué genotipo(s) era(n) diferente(s). Las pruebas estadísticas indicaron que la mutante sencilla *wip2*, así como la doble mutante *wip2 wip3* tienen un comportamiento similar a la *Wt*. El ddgf en estos tres genotipos es similar, mientras que el genotipo que tiene un retraso en el ddgf es *wip3*. Los genotipos se agruparon en dos diferentes conjuntos: "a" en

donde se encuentran *Wt*, *wip2*, *wip2 wip3* y “b” en donde se ubica *wip3* (Figura 6).

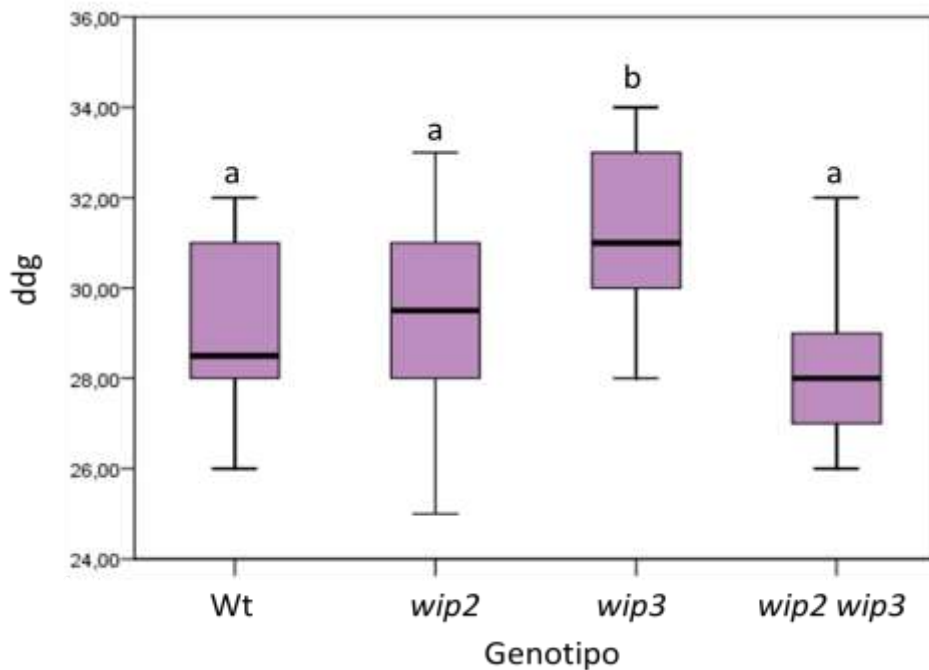


Figura 6. Número de días transcurridos desde la germinación hasta la aparición de los capullos de la inflorescencia (ddgf) en *wip2*, *wip3*, *wip2 wip3* y *Wt* en otoño. Gráfica de caja y bigote, medianas con la misma letra o grupo estadístico no difieren; n=24 por genotipo (Kruskal-Wallis Pvalue=0.000025914).

6.1.2 Evaluación del nhf en mutantes sencillas *wip2*, *wip3*, dobles mutantes *wip2 wip3* en otoño

Al mismo tiempo que se registró el ddgf también se registró el nhf. Al contar con todos los datos se procedió a realizar el análisis estadístico de Kruskal-Wallis, en el cual se obtuvo como resultado que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro genotipos en cuanto al nhf (Pvalue=0.077) (Figura 7).

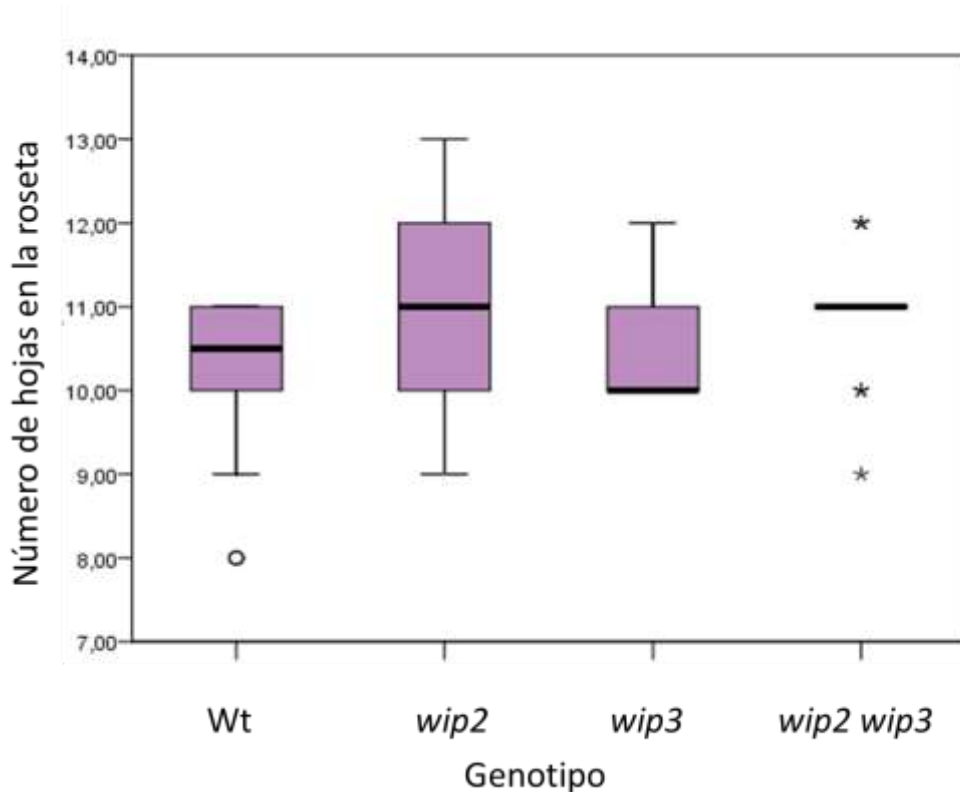


Figura 7. Número de hojas en la roseta cuando los capullos de la inflorescencia son visibles en el ápice (nhf) en *wip2*, *wip3*, *wip2 wip3* y *Wt*, en otoño. Gráfica de caja y bigote, la prueba de Kruskal-Wallis demuestra que no hay diferencias estadísticamente significativas (Pvalue=0.077 n=24 por genotipo).

6.1.3 Evaluación del ddgf en mutantes sencillas *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, dobles mutantes *wip2 wip3* y *wip2 wip5* en primavera

Los resultados de tiempo de floración en otoño (ddgf y nhf) permitieron confirmar observaciones previas en laboratorio de Identidad Celular. Sin embargo, con el presente trabajo se buscó explorar el comportamiento de los demás genotipos incluidos en el estudio, Para ello, evaluando estas mismas variables se analizaron los siete genotipos *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3*, *wip2 wip5* y *Wt*, en primavera.

Se evaluó el ddg de los siete genotipos. El análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo por medio de una prueba de Kruskal-Wallis, la cual demostró que existen diferencias estadísticamente significativas entre los siete genotipos (Pvalue=0.001). En este muestreo no existen diferencias entre los genotipos

mutantes con la planta Wt, sin embargo, entre los genotipos mutantes hay variación, todos los genotipos a excepción de *wip2 wip5* tienen un ddgf similar. La prueba estadística Stepwise-Stepdown agrupó en dos conjuntos a los siete genotipos: “a” donde se encuentra Wt y *wip2 wip5*, “b” conformado por Wt, *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5* y *wip2 wip3* (Figura 8).

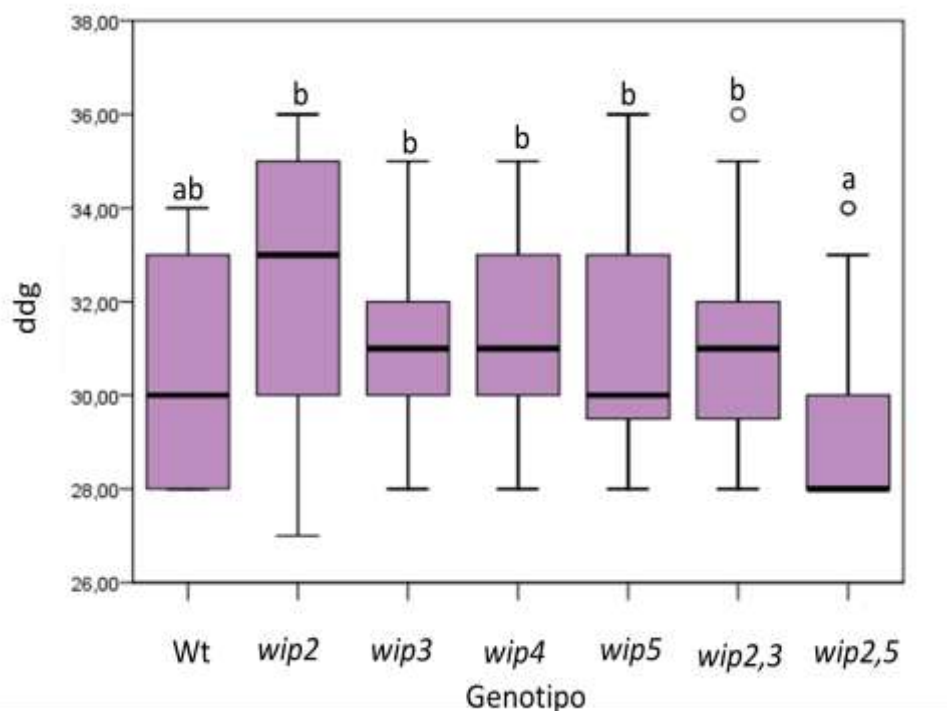


Figura 8. Número de días transcurridos desde la germinación hasta la aparición de los capullos de la inflorescencia (ddgf) en *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3*, *wip2 wip5* y Wt, en primavera. Gráfica de caja y bigote, medianas con la misma letra o grupo estadístico no difieren, n=24 por genotipo (Kruskal-Wallis Pvalue=0.001).

6.1.4 Evaluación de nhf en mutantes sencillas *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, dobles mutantes *wip2 wip3* y *wip2 wip5* en primavera

El nhf fue otro parámetro que se evaluó en primavera, al igual que en otoño. Sin embargo, en primavera se agregaron los genotipos de mutantes sencillas *wip4*, *wip5* y la doble mutante *wip2 wip5*. El análisis se realizó en los meses de abril-mayo (2016). Una vez que se obtuvieron los datos de las muestras se realizó la prueba de Kruskal Wallis, en la cual se obtuvo como resultado que hay diferencias estadísticamente significativas en los siete genotipos (Pvalue=0.001). Para saber cómo diferían los genotipos se realizó la prueba de

Stepwise-Stepdown, los genotipos se agruparon en dos conjuntos, en el grupo “b” *Wt*, *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5* y *wip2 wip3*, en el grupo “a” está *wip2 wip5* (Figura 9).

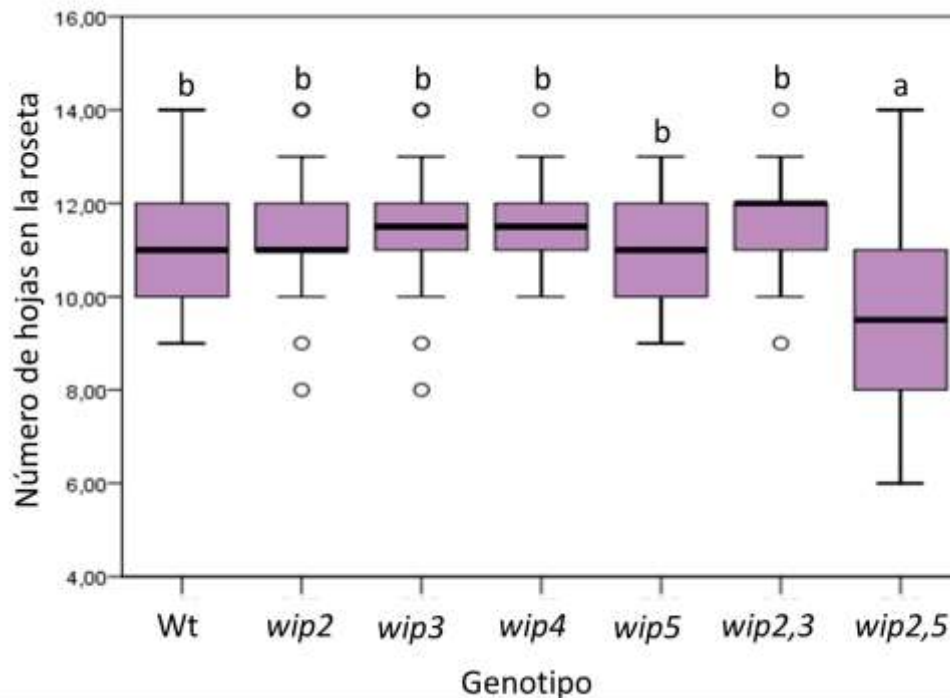


Figura 9. Número de hojas en la roseta cuando los capullos de la inflorescencia son visibles en el ápice (nhf) en *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3*, *wip2 wip5* y *Wt*, en primavera. Gráfica de caja y bigote, medianas con la misma letra o grupo estadístico no difieren, n=24 por genotipo (Kruskal Wallis Pvalue= 0.001).

En conclusión, para los análisis realizados en las dos estaciones, se encontraron genotipos que mostraron diferencias en cuanto al ddgf o nhf con respecto a las plantas *Wt*. En el muestreo de otoño se observó un retraso en ddgf en *wip3*, mientras que en primavera se encontró que la mutante *wip2 wip5* presentaba un menor nhf que la planta silvestre. Estas diferencias fueron moderadas.

6.2 Evaluación de la hoja de la roseta a 30 ddg y 60 ddg

La roseta en *wip2 wip5*, es una estructura que ha presentado diferencias notorias con respecto a la *Wt*, es estudios previos en el laboratorio (Díaz, 2015). Como una estrategia para conocer la causa de dicho fenotipo, en el presente trabajo se analizó la hoja de la roseta, así como el área y número de las células de la epidermis de la hoja. Para ello se obtuvieron micrografías con el microscopio digital KEYENCE de las células de la epidermis de la hoja y de la hoja completa de *Arabidopsis* a los 30 ddg (Figura 10)

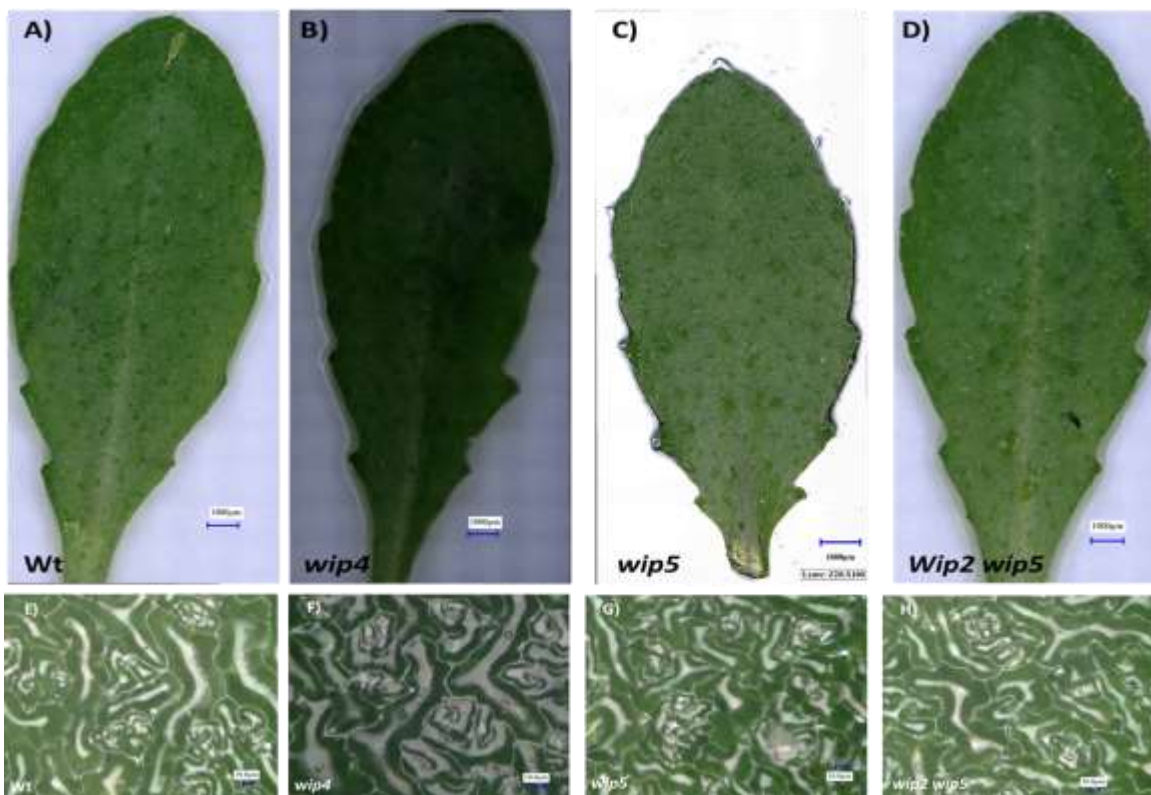


Figura 10. **Micrografías de hoja completa y de células de la epidermis de hoja de la roseta de *Arabidopsis* a los 30 ddg.** (A-D) hojas de roseta, (E-H) células de la epidermis de la hoja de la roseta. A los 30 ddg estadísticamente las células de la planta silvestre (E) son más grandes que los demás genotipos por ejemplo *wip4* (F), *wip5* (G) y *wip2 wip5* (H). Micrografías tomadas con microscopio digital KEYENCE.

Así mismo se obtuvieron micrografías a los 60 ddg (Figura 11).

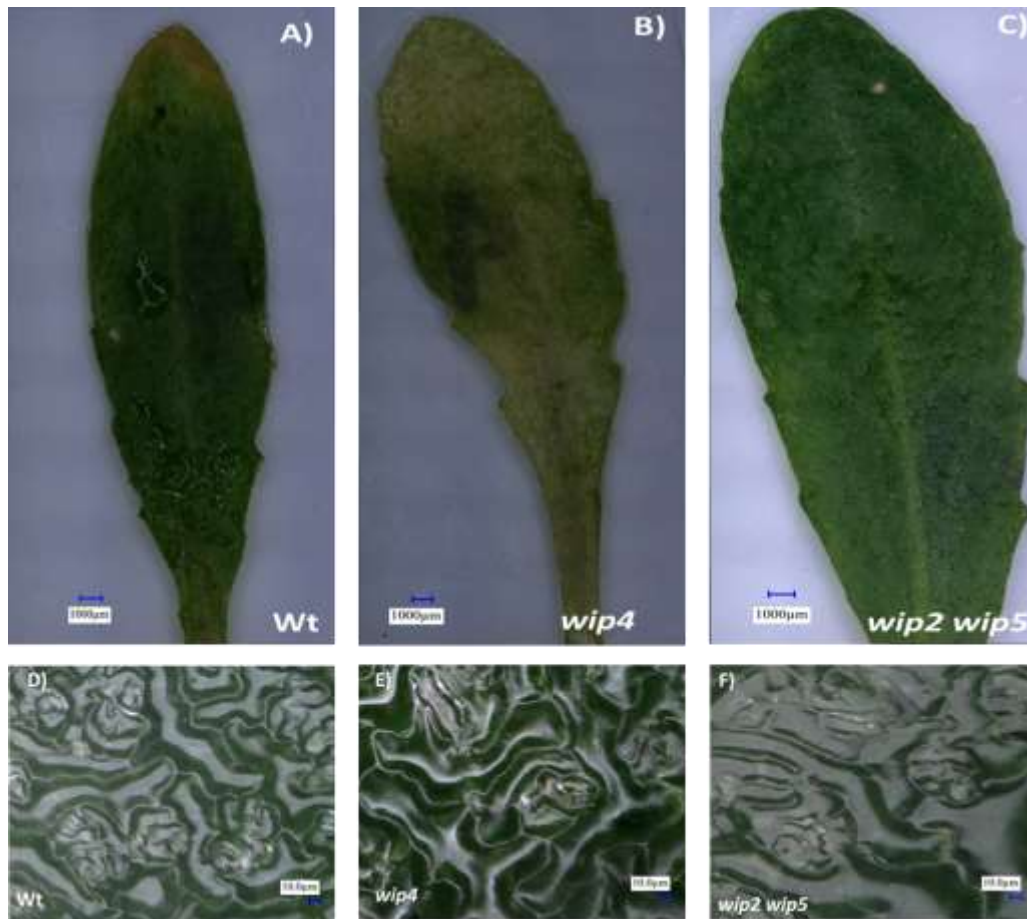


Figura 11. **Micrografías de hoja completa y de células de la epidermis de hoja de la roseta de *Arabidopsis* a los 60 ddg.** (A-C) hojas de roseta, (D-F) células de la epidermis. Estadísticamente las células de la planta silvestre (D) son más pequeñas que *wip4* (E) y *wip2 wip5* (F). Micrografías tomadas con microscopio digital KEYENCE.

6.2.1 Evaluación del área de la hoja de la roseta en mutantes sencillas *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, dobles mutantes *wip2 wip3* y *wip2 wip5*, a los 30 días después de la germinación (30 ddg)

Los resultados obtenidos del área de las hojas de la roseta se analizaron por medio de una prueba ANOVA, se obtuvo como resultado que, a los 30 ddg, los tamaños de las hojas de los genotipos evaluados son estadísticamente diferentes (Pvalue=0.0113). Posteriormente se realizó un análisis de LSD para saber qué genotipos presentaban áreas foliares diferentes (ambos análisis estadísticos se realizaron con Statgraphics Centurion XVI). La prueba de LSD ubico a los genotipos en tres grupos estadísticos: “a” donde se encuentra *wip2*, *wip4*, *wip5* y *wip2 wip3*; “b” con *wip2*, *wip3*, *wip4*, y *wip2 wip3*; “c” donde se

encuentra *Wt*, *wip3* y *wip2 wip5*. Algunos genotipos comparten grupos estadísticos debido a la similitud en sus áreas. La hoja 8 de *wip2*, *wip4*, *wip5* y *wip2 wip3*, era menor al área de la hoja 8 de las plantas *Wt*, sin embargo, la mayor diferencia se observa en *wip5*, cuya área es menor con respecto a la *Wt*. (Figura 12).

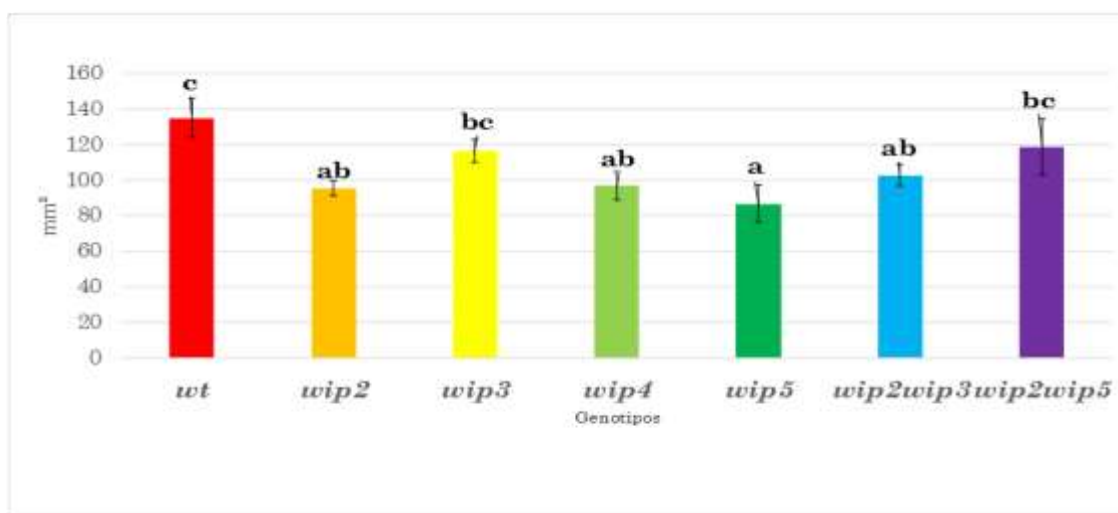


Figura 12. Área de la hoja de la roseta a 30 días después de la germinación (30 ddg) de *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3*, *wip2 wip5* y *Wt*. Gráfica de barras; medias con la misma letra o grupo estadístico no difieren de acuerdo a la prueba de LSD, las líneas verticales en las barras indican el error estándar, n=10 por genotipo (ANOVA Pvalue= 0.0113).

6.2.2 Evaluación del área de las células de la epidermis de la hoja de la roseta en mutantes sencillas *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, dobles mutantes *wip2 wip3* y *wip2 wip5*, a los 30 días después de la germinación (30 ddg)

Los resultados obtenidos de la medición del área de las células de la epidermis se analizaron por medio de una prueba de ANOVA en la cual se observó que hay diferencias estadísticamente significativas entre los siete genotipos (Pvalue= 0.0008). Al realizar el análisis de LSD se observó que los genotipos se clasificaban en diferentes grupos: “a” con *Wt* y *wip5*; “b” con *Wt*, *wip2*, *wip4*, *wip2 wip3* y *wip2 wip5*; “c” con *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip2 wip3*, y *wip2 wip5*. El genotipo con una mayor área en sus células es *wip3*, los demás genotipos tienen un área celular similar (Figura 13).

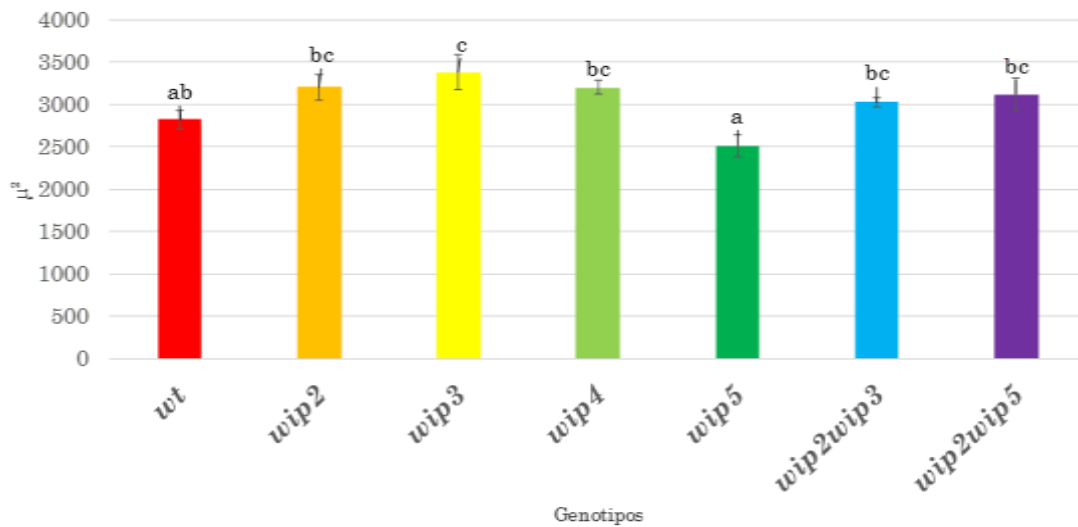


Figura 13. Área de las células de la epidermis de la hoja de la roseta a los 30 ddg en *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3*, *wip2 wip5* y *Wt*. Gráfica de barras; medias con las mismas letras o grupos estadísticos, no difieren de acuerdo a la prueba LSD, las líneas verticales de las barras indican el error estándar, n=20 por genotipo (ANOVA Pvalue=0.0008).

6.2.3 Evaluación del número de las células de la epidermis de la hoja de la roseta en mutantes sencillas *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, dobles mutantes *wip2 wip3* y *wip2 wip5*, a los 30 días después de la germinación (30 ddg)

El número de células en la hoja juega un rol importante en el tamaño final de dicho órgano. A los 30 ddg el número de células en la epidermis de la hoja de la roseta se evaluó en cada uno de los genotipos, al obtenerse todos los resultados se realizó una prueba estadística de ANOVA, en la cual se obtuvo que hay diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos (Pvalue=0.0215), al realizarse la prueba de LSD, los genotipos se agruparon en los siguientes conjuntos: “a” *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5* y *wip2 wip3*; “b” con *wip3*, *wip2 wip3* y *wip2 wip5*; “c” en donde se encuentran *Wt*, *wip2 wip3* y *wip2 wip5*. Los genotipos con menor número de células y por lo tanto los que más difieren con respecto a la *Wt* son *wip2*, *wip3*, *wip4* y *wip5* (Figura 14).

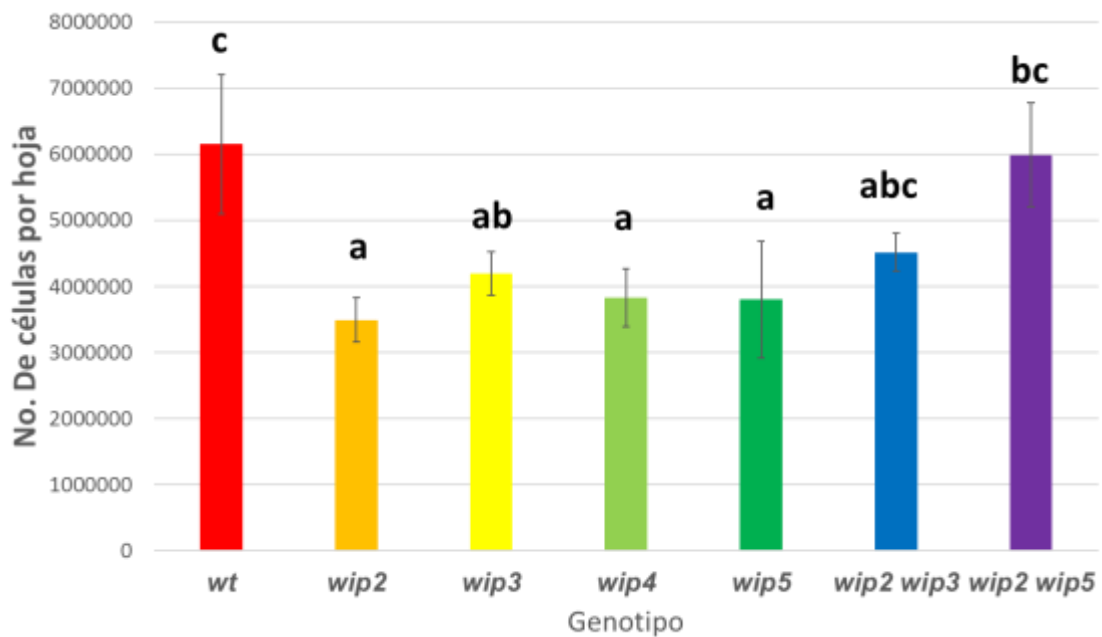


Figura 14. **Número de células de la epidermis de la hoja de la roseta a los 30 ddg en *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3*, *wip2 wip5* y Wt.** Gráfica de barras; medias con la misma letra o grupo estadístico no difieren de acuerdo a la prueba LSD, las líneas verticales en las barras indican el error estándar, n=10 por genotipo (ANOVA Pvalue=0.0215).

En resumen; *wip2*, *wip4* y *wip5* tienen hojas de menor área y un menor número de células con respecto a la Wt, pero con el área de las células de la epidermis de la hoja similar a la planta silvestre. El tamaño de la hoja de *wip3* es similar a la Wt, pero con un menor número de células, aunque de mayor área. El área de las células, así como el número de células de *wip2 wip3*, es similar a la Wt, aunque el área de la hoja es menor. La doble mutante *wip2 wip5* tiene un comportamiento muy similar a la Wt en los tres parámetros.

6.2.4 Evaluación del área de la hoja de la roseta en mutantes sencillas *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, dobles mutantes *wip2 wip3* y *wip2 wip5*, a los 60 días después de la germinación (60 ddg)

Para el análisis del área de la hoja de la roseta a los 60 ddg, la prueba ANOVA demostró que hay diferencias estadísticamente significativas (Pvalue=0.0141). Se realizó la prueba de comparación de medias LSD. Al obtener los resultados se observó que los genotipos se asociaban en diferentes grupos estadísticos: "a" donde se encuentra Wt, *wip3*, *wip5* y *wip2 wip3*; "b" con *wip2*, *wip3*, *wip5* y

wip2 wip3; “c” con *wip2*, *wip4* y *wip2 wip5*. Los genotipos que más difieren de la Wt son *wip2*, *wip4* y *wip2 wip5*, cuyas hojas son de mayor área (Figura 15).

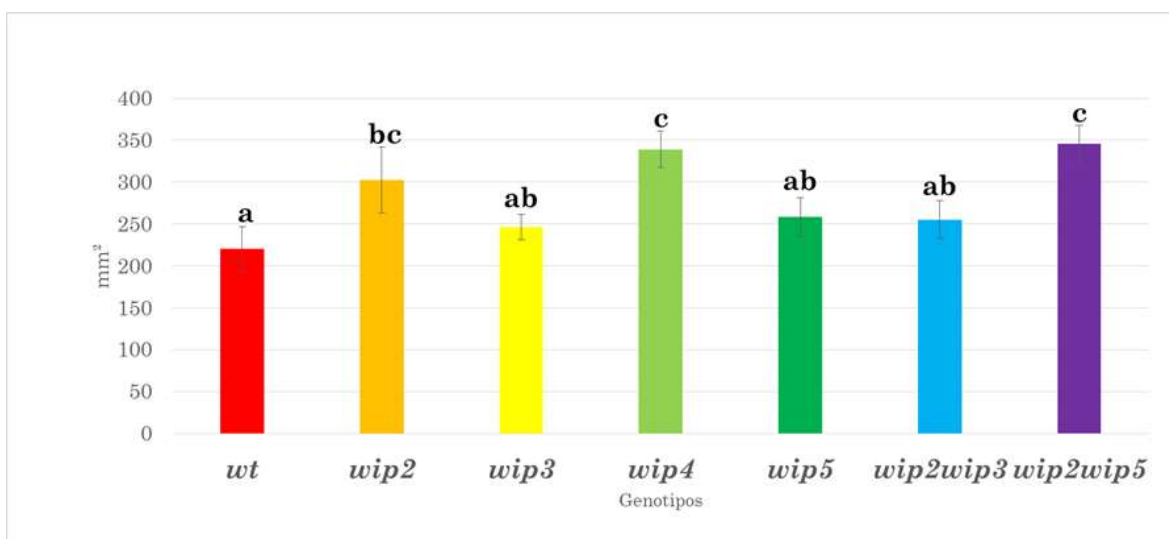


Figura 15. Área de la hoja de la roseta a 60 días después de la germinación (60 ddg) de *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3*, *wip2 wip5* y Wt. Gráfica de barras; medias con la misma letra o grupo estadístico no difieren de acuerdo a la prueba de LSD; las líneas verticales en las barras indican el error estándar, n=10 por genotipo (ANOVA Pvalue= 0.0141).

6.2.5 Evaluación del área de las células de la epidermis de la hoja de la roseta de mutantes sencillas *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, dobles mutantes *wip2 wip3* y *wip2 wip5*, a los 60 días después de la germinación (60 ddg)

Las células de la epidermis de la hoja de la roseta de las plantas de *Arabidopsis* analizadas a los 30 ddg (hoja 8) se volvieron a analizar a los 60 ddg (hoja 10). Los datos del análisis fueron evaluados por medio de una prueba de ANOVA, donde se obtuvo como resultado que existen diferencias estadísticamente significativas entre los siete genotipos (Pvalue=0.0001). Posteriormente se realizó un análisis de medias, el cual clasificó a los genotipos en cuatro grupos estadísticos: “a” con Wt y *wip2 wip3*; “b” con *wip2*, *wip3* y *wip2 wip3*; “c” con *wip2*, *wip3* y *wip2 wip5*; “d” con *wip4* y *wip2 wip5*. A excepción de *wip2 wip3*, todos los genotipos tienen el área de las células mayor que la Wt, sin embargo, esta diferencia es más evidente en *wip4* y *wip2 wip5* (Figura 16).

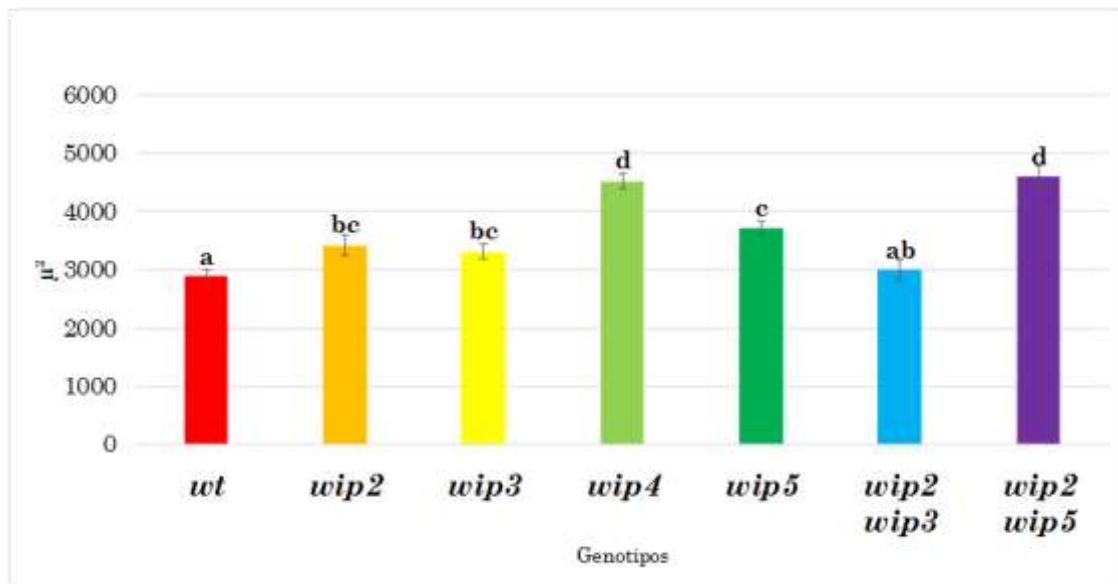


Figura 16. Área de las células de la epidermis de la hoja de la roseta a los 60 días después de la germinación (60 ddg) en *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3*, *wip2 wip5* y *Wt*. Gráfica de barras; medias con la misma letra o grupo estadístico no difieren de acuerdo a la prueba de LSD; las líneas verticales en las barras indican el error estándar, n=20 por genotipo (ANOVA Pvalue=0.0001).

6.2.6 Evaluación del número de células en la epidermis de la hoja de la roseta de mutantes sencillas *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, dobles mutantes *wip2 wip3* y *wip2 wip5*, a los 60 días después de la germinación (60 ddg)

El número de células en la epidermis de la hoja de la roseta se volvió a evaluar a los 60 ddg. Al realizarse la prueba estadística de ANOVA, como resultado se obtuvo que existen diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos (Pvalue=0.0012). La prueba de LSD, agrupó a los genotipos en cuatro diferentes conjuntos estadísticos: “a” conformado por *wip3*, *wip4*, *wip5* y *wip2 wip5*; “b” conformado por *wip2*, *wip3*, *wip5* y *wip2 wip5*; “c” conformado por *Wt*, *wip2*, *wip3* y *wip5*; “d” conformado por *Wt* y *wip2 wip3*. Los genotipos se comportan de manera similar a la *Wt*, a excepción de *wip4* y *wip2 wip5*, que tienen menor número de células, estos dos genotipos son además muy diferentes con respecto a la doble mutante *wip2 wip3* (Figura 17).

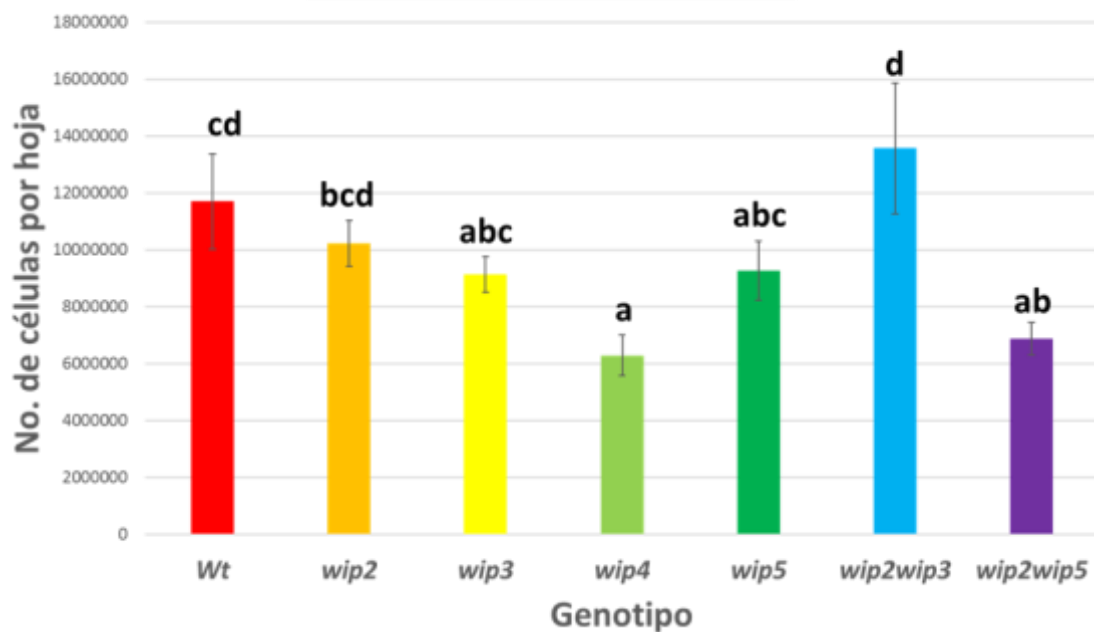


Figura 17. Análisis del número de las células de la hoja de la roseta a los 60 días después de la germinación (60 ddg) en *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3*, *wip2 wip5* y *Wt*. Gráfica de barras; medias con la misma letra o grupo estadístico no difieren de acuerdo a la prueba de LSD; las líneas verticales en las barras indican el error estándar, n=10 por genotipo (ANOVA Pvalue=0.0012).

En resumen; *wip4* y *wip2 wip5* son los genotipos que difieren más con respecto a la *Wt*, el área de sus hojas y células es mayor, aunque tienen un menor número de células. A diferencia de la *Wt*, las hojas de *wip2* son de mayor área al igual que sus células, pero ambos genotipos tienen similar número de células. El área de las hojas y el área de las células de *wip3* es mayor que la *Wt*, pero tienen un número de células similar, lo mismo ocurre en *wip5*. El genotipo con un comportamiento similar a la *Wt* en los tres parámetros evaluados es *wip2 wip3*.

6.3 Evaluación histológica de los tejidos internos del tallo en *wip2*, *wip5* y *wip2 wip5* comparados con la planta silvestre (*Wt*)

Los cortes transversales de tallo teñidos con floroglucinol fueron observados en el microscopio estereoscópico en campo claro y se obtuvieron micrografías de cada genotipo (Figura 18).

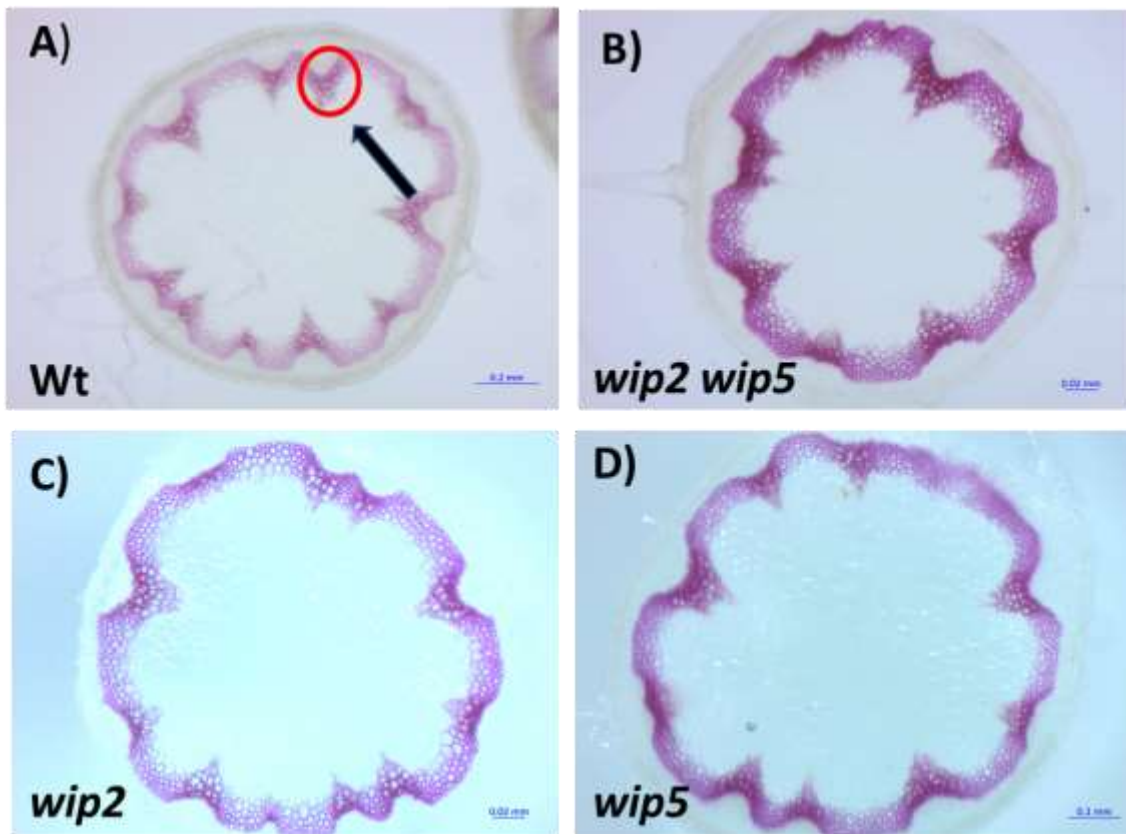


Figura 18. **Micrografías de cortes transversales de tallo teñidos con floroglucinol.** Cortes transversales de tallo de plantas de *Arabidopsis thaliana* en donde se observan los haces vasculares teñidos. **A)** Wt, el círculo y la flecha indican un haz vascular, **B)** *wip2 wip5* **C)** *wip2* **D)** *wip5*.

Al obtener las micrografías fue interesante observar que el tamaño de los tallos variaba entre cada genotipo, además de que el número de haces vasculares también era diferente (Figura 18). Por lo que se procedió a medir el diámetro de los tallos con el software ImageJ y a contar el número de haces vasculares en dichos tallos. Los resultados se analizaron por medio de las pruebas estadísticas de ANOVA y Kruskal-Wallis, respectivamente.

Para la evaluación del diámetro de los tallos, la prueba de ANOVA demostró que hay diferencias estadísticamente significativas (Pvalue= 0.0282) entre los cuatro genotipos evaluados; la prueba de LSD agrupo en dos diferentes conjuntos estadísticos: “a” donde se encuentra Wt, *wip2* y *wip5*; “b” donde se encuentra Wt, *wip5* y *wip2 wip5* (Figura 19A). Posteriormente se contabilizaron el número de haces en los tallos, al obtenerse los datos se analizaron por

medio de una prueba Kruskal-Wallis. Para esta evaluación también existieron diferencias estadísticamente significativas (Pvalue= 0.02). Para conocer el comportamiento de los datos, se procedió a realizar una prueba de Stepwise-Stepdown, esta prueba indica que en el grupo “a” se encuentra *wip2 wip5* y que en el grupo “b” esta *Wt*, *wip2* y *wip5* (Figura 19B).

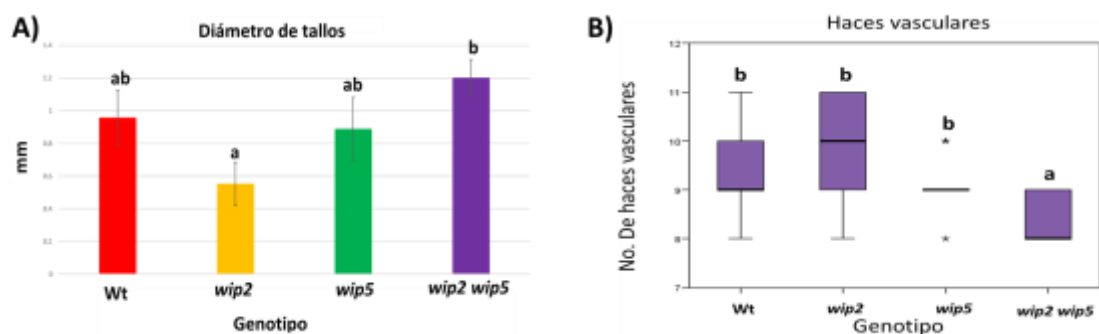


Figura 19. **Diámetro y número de haces vasculares del tallo en *wip2*, *wip5*, *wip2 wip5* comparados con la *Wt*.** (A) Gráfica de barras, medias con la misma letra o grupo estadístico no difieren de acuerdo a la prueba LSD; las líneas verticales en las barras indican el error estándar (ANOVA Pvalue= 0.0282). (B) Medianas con la misma letra o grupo estadístico no difieren; las líneas verticales en las barras indican el error estándar (Kruskal-Wallis Pvalue= 0.02).

6.4 Evaluación de la expresión de *WIP2* mediante el gen reportero *GUS*

Las fusiones transcripcionales de la línea marcadora p*WIP2*::*GUS* en plántulas de *Arabidopsis* de 9 a 12 días ddg demuestran que la transcripción de este gen es activa en células del meristemo apical, principalmente en la zona medular y en la vasculatura de las hojas (Ramos, 2013). En el presente trabajo se buscó ampliar el conocimiento acerca de los tejidos, así como también los estadios de crecimiento de *Arabidopsis* en los cuales *WIP2* se está expresando. Para ello se sembraron semillas de la línea transcripcional p*WIP2*::*GUS* en placa con medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y en charolas con sustrato de mezcla de tierra para *Arabidopsis*. Las semillas en placas se dejaron crecer por nueve días y las plantas en charola por 40 días, esto para evaluar la expresión de *WIP2* a diferentes tiempos y en diferentes tejidos (Figura 20-22). Las plántulas y los tallos fueron clareados mediante lavados de alcohol a diferentes concentraciones y tiempos. A los tallos de 40 ddg se les realizaron cortes

transversales de la parte apical y de la parte basal, sin embargo, la tinción azul que da la solución GUS no se observó en los cortes transversales de la parte basal del tallo (entre los 2 a 4 cm sobre la base) (Figura 20A, B y C).

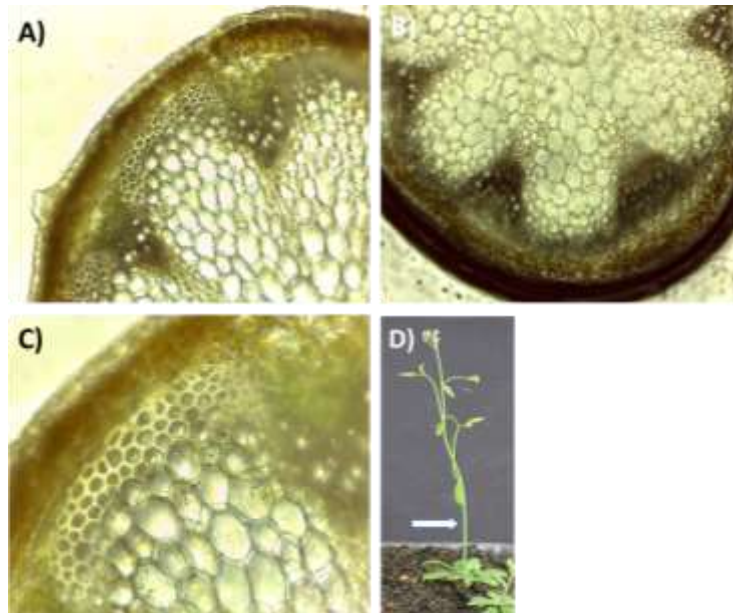


Figura 20. **Micrografías de cortes transversales de tallos de *Arabidopsis thaliana* (parte basal del tallo)**. Cortes transversales de parte basal de tallo de *Arabidopsis* de 40 ddg. **(A, B, C)** 20x A y C, 40x C. Tallos en los cuales no se observa la tinción de GUS. **(D)** Planta de *Arabidopsis*, la flecha blanca indica la zona en donde se realizaron los cortes transversales.

La expresión de *WIP2*, solamente se observó en los cortes transversales de la parte apical del tallo (Figura 21E), en los haces vasculares de los tallos (Figura 21A y B), en la vasculatura de las hojas (Figura 21C) y en la vasculatura de los pétalos (Figura 21D) de plantas de 40 ddg.

En plántulas de 9 ddg, se observó que *WIP2* se expresó en la raíz (Figura 22C y E) y en la vasculatura del hipocótilo (Figura 22A y D), tejidos que anteriormente no habían sido reportados. Las muestras fueron observadas con el microscopio óptico y estereoscópico, y se obtuvieron micrografías de dichas muestras.

Con estos resultados se observa que *WIP2* se expresa en la vasculatura de diversos tejidos.

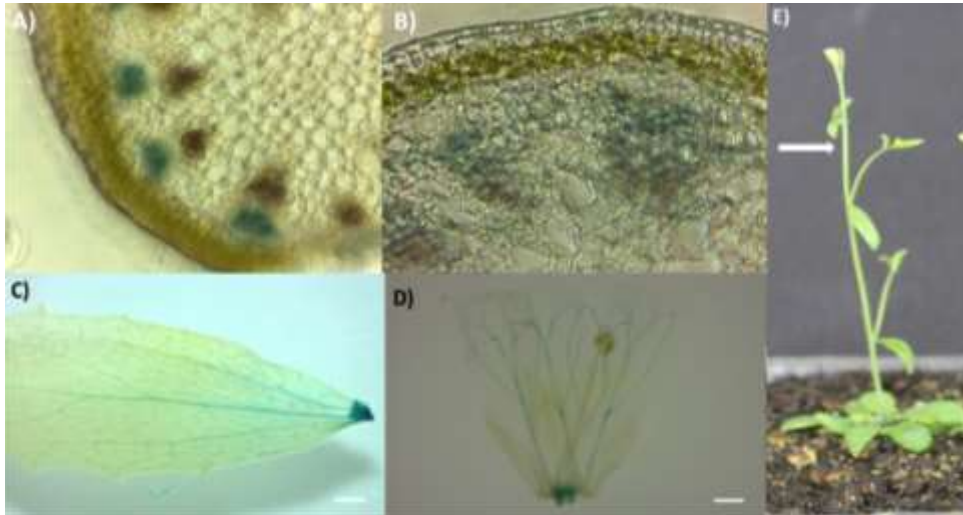


Figura 21. **Expresión de pWIP2::GUS en plantas de 40 ddg.** Cortes transversales de tallo a 20x (A), 40x (B); hoja caulina 10x, barra=1 mm (C); flor 10x, barra=0.5 mm (D).

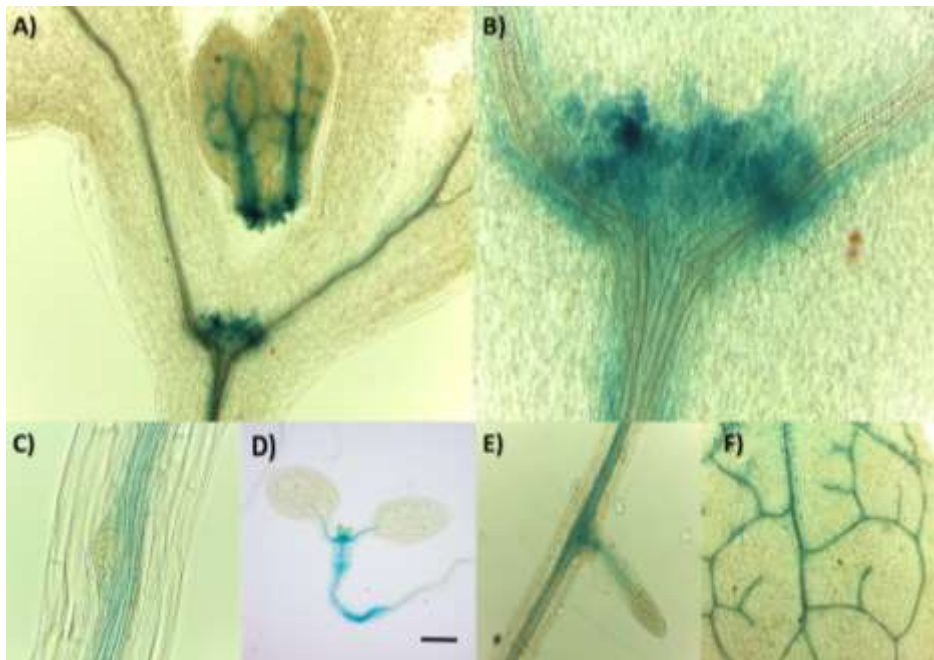


Figura 22. **Expresión de pWIP2::GUS en plántulas de 9 ddg.** Plántula de 9 ddg, barra= 0.5 mm (D); meristemo apical del tallo 10x (A) y 40x (B), raíces 40x (C), 20x (E); vasculatura de la hoja de hipocótilo 20x (F).

7. DISCUSIÓN

7.1 El tiempo de floración en *Arabidopsis* está afectado ligeramente en las mutantes *wip3* y *wip2 wip5*

La floración en *Arabidopsis* está modulada por diversos factores genéticos y ambientales (Bernier *et al.*, 1993), tanto bióticos como abióticos (Hegland *et al.*, 2009). Por ejemplo, el fotoperiodo y la temperatura son estímulos claves en este proceso (Song *et al.*, 2015; Andres y Coupland, 2012., Kim *et al.*, 2009). Las plantas poseen mecanismos moleculares para sensor y responder a dichos cambios y cualquier alteración (en alguno de los factores) afecta de manera ligera o severa la floración.

En los resultados obtenidos del análisis del número de días que transcurren desde la germinación hasta que aparecen los capullos de la inflorescencia (ddgf) realizados en otoño, se observó que *wip3* presenta un retraso, comparado con la Wt. En el muestreo realizado en primavera no hay diferencias entre todos los genotipos (mutantes y Wt), pero si las hay entre los genotipos mutantes, siendo *wip2 wip5* el genotipo que difiere de las demás mutantes. Los muestreos se realizaron en diferentes épocas del año en invernadero, y la cantidad de horas de luz a la que estuvieron expuestas las plantas fue diferente, posiblemente la diferencia de resultados se deba a que las mutantes responden de un modo diferente a la longitud del día. Entre los diversos mecanismos moleculares que posiblemente estén afectados y que puedan explicar la diferencia en el número de días transcurridos desde la germinación hasta la aparición de los capullos de la inflorescencia (ddgf), está el ejemplo de la expresión del gen *FLOWERING LOCUS T (FT)* cuyos niveles de transcritos son bajos en días cortos (8 h luz y 16 h de oscuridad) y temperaturas bajas (22°C) y niveles altos en días largos (16 h luz y 8 h oscuridad) acelerando el tiempo de floración (Suárez-López *et al.*, 2001). En ambos muestreos tanto las condiciones de luz como de temperatura variaron en las dos ocasiones. En el muestreo realizado en otoño los días son más cortos, la duración de la luz del día es menor y las temperaturas son menores provocando un retraso en la floración en plantas como *Arabidopsis* (Kobayashi y Weigel, 2007). Sería muy interesante evaluar los niveles de *FT* en *wip3* y en

wip2 wip5 en las diferentes condiciones experimentales, compararlos con los demás genotipos, y realizar un análisis de interacciones genéticas con otros genes reguladores de la floración, como una estrategia para buscar explicar los cambios en este proceso. Y de esta manera conocer si los FTs *WIP* regulan a genes involucrados en la floración.

Por otra parte, el número de hojas en la roseta (*nhf*) también se vio afectada en el estudio. En el muestreo de primavera, fue *wip2 wip5* el genotipo diferente a la *Wt*, al presentar un menor número de hojas. Las hojas son órganos que se forman a partir de los meristemas. Probablemente estos genes tienen un ligero control en las actividades meristemáticas de la planta, y es en la doble mutante *wip2 wip5* donde este ligero control de funciones es evidente.

Los cambios observados en ambos parámetros para evaluar la floración (*ddgf* y *nhf*) no son muy severos, lo que podría deberse a una redundancia de funciones con alguno de los miembros restantes de la familia *WIP*, que no formaron parte del estudio. Posiblemente, el estudio de triples mutantes (*nww*) permitirá arrojar datos más precisos acerca de un rol ligero, importante o nulo de esta familia de factores de transcripción en la floración. Por el momento sólo se puede generalizar que estos factores de transcripción están involucrados, de una manera moderada, en el proceso de transición de la etapa vegetativa a la etapa reproductiva de la planta.

El entendimiento de los mecanismos por los cuales la planta hace la transición de la fase vegetativa a la etapa reproductiva en *Arabidopsis* es de alto nivel de interés y podría adquirir mayor relevancia en caso de que estos resultados pudieran extrapolarse a plantas con importancia agronómica.

7.2 Los genes *WIP4* y *WIP2 WIP5* afectan el tamaño final de la hoja de la roseta en *Arabidopsis*

Las hojas representan gran parte de la biomasa de la planta. Son los órganos que perciben mayor cantidad de luz, y están especializadas para la fotorrespiración y la fotosíntesis.

Por tanto, el tamaño de dichos órganos adquiere relevancia para la planta completa. Al igual que en los demás órganos, el tamaño final de las hojas está determinado por la expansión y la proliferación celular (Vanhaeren *et al.*, 2016;

Anastasiou *et al.*, 2007 Mizukami *et al.*, 2001). Los factores ambientales y los factores genéticos a través de su efecto en la proliferación y expansión celular modulan el tamaño de los órganos como las hojas.

A los 30 ddg, el tamaño de la hoja de la roseta es menor en cuatro genotipos y muy similar a la Wt en dos genotipos. Los genotipos más sobresalientes en este primer muestreo son *wip2*, *wip4* y *wip5*. Estos tres genotipos se encuentran en el grupo con hojas más pequeñas. Comparados con la Wt, sus células son de similar tamaño, aunque tienen un menor número. A los 60 ddg, el tamaño de las hojas de la roseta es mayor en la mitad de los genotipos y similar a la Wt en la otra mitad. Es interesante observar que los genotipos diferentes del primer muestreo siguen la misma tendencia, aunque no al mismo nivel. En esta segunda evaluación los genotipos con diferencias más sobresalientes son *wip2 wip5* y nuevamente *wip4*. El mayor tamaño en la hoja de la roseta en *wip4* y *wip2 wip5* es debido a un menor número de células, pero con áreas mayores. A pesar de que en ambos muestreos los genotipos en los cuales se encontró una mayor diferencia fueron distintos, es importante recalcar la diferencia con respecto a la Wt que existió en *wip2*, *wip4* y *wip5*, pues al realizar un árbol filogenético con las seis proteínas, son WIP2, WIP4 y WIP5 las más cercanamente relacionadas. Además, en estudios previos se ha reportado que WIP2, WIP4 y WIP5 son esenciales en la formación de la raíz y estos tres genes pueden cada uno, de manera individual cumplir esa función; sin embargo, las plantas que carecen de los tres genes (como en la triple mutante de *ntt*, *wip4* y *wip5* (*nww*)) no tienen raíz (Crawford, 2015). Con los resultados obtenidos y estos antecedentes, cabe la posibilidad de que exista una redundancia de funciones de estos tres genes también en el control del tamaño de la hoja. Se observó que en las plantas que carecían de la función de uno de los genes (*WIP2*, *WIP4* o *WIP5*) mostraban un fenotipo alterado ligero, el cual aumenta cuando la planta carece de dos genes, como es el caso de la doble mutante (*wip2 wip5*). El genotipo que sería importante seguir monitoreando es *wip4*, pues en ambos tiempos es el que más difiere de todos con respecto a la Wt. Estudios para evaluar el tamaño de las hojas de la roseta en la doble mutante *wip2 wip4* o la triple mutante *nww*, arrojarían mayor

información que ayude a determinar la redundancia genética en esta familia de factores de transcripción.

Es importante remarcar que, en los dos tiempos muestreados, los genotipos que presentan diferencia en el tamaño de la hoja de la roseta ya sea menor o mayor, comparados con la *Wt*, siempre presentan un menor número de células. El área de estas células no difiere en el primer muestreo, es hasta los 60 ddg cuando esta diferencia es evidente; por ejemplo, en *wip4* y *wip2 wip5*. Un posible mecanismo que podría estar afectado es la expansión celular, proceso que aumenta el volumen celular una vez que las células han dejado de dividirse, y que, junto con la división celular, forman parte del crecimiento. Aunque las hojas que se evaluaron fueron diferentes, si asumimos que su tasa de crecimiento (incluyendo división y expansión celular) es equivalente, podemos obtener mayor información de cuál proceso y cómo está afectado en las mutantes. En los resultados, *wip4* a los dos tiempos (hoja 8 y hoja 10) tiene menor número de células que la *Wt*, a los 30 ddg la hoja 8 es más pequeña, a los 60 ddg la hoja 10 es más grande, en comparación con la *Wt*, demostrando con esto que las células en este genotipo, conforme pasa el tiempo, no aumentan tanto en número, pero si lo hacen en área, determinando así el tamaño final de la hoja. En *wip2 wip5* ocurre algo diferente, a los 30 ddg el número de células y el tamaño de la hoja 8 es similar a la *Wt*, sin embargo, a los 60 ddg el número de las células es menor en la hoja 10 pero la hoja presenta un mayor tamaño. Las hojas tienen crecimiento determinado, cuando las células de la punta de la hoja cesan su división comienzan a expandirse, mientras que las células de la base aún se dividen (González *et al.*, 2012; Fournier *et al.*, 2005). Con los resultados obtenidos se puede observar que probablemente en los genotipos *wip4* y *wip2 wip5* este proceso esté siendo alterado. Es interesante que para *wip4* la alteración pueda deberse a una tasa de división menor que la silvestre, puesto que la hoja 8 a los 30 días ya tiene un número menor de células, y hay un aumento moderado en la hoja 10 a los 60 días con respecto a la 8 hoja a los 30 días. Para la mutante *wip2 wip5* podría deberse a un arresto más temprano de la división (puesto que la hoja 8 a los 30 días tiene un número de células equivalente a la silvestre, lo cual sugiere que su tasa de división celular hasta ese momento era parecida a la

silvestre). Sería interesante realizar un análisis de estos factores de transcripción con genes involucrados en la división celular, para determinar si tienen un efecto en este proceso, y si participan, en qué nivel lo hacen.

En ambos genotipos al igual que en todos, llega un momento en que las células dejan de dividirse y comienzan a crecer; sin embargo, dicha expansión celular es mayor en *wip4* y *wip2 wip5*. Esta es posiblemente la explicación en la diferencia del tamaño observada en las mutantes. Se ha reportado un mecanismo de compensación en el caso de la determinación del tamaño final de la hoja en donde es crucial la actividad meristemática, así como el balance entre la proliferación-diferenciación y cualquier perturbación en los mecanismos intrínsecos conectados a su regulación genética, conduce a una respuesta celular, que neutraliza al menos parcialmente el posible impacto de dicha perturbación a nivel de órgano (Horiguchi, 2007). Ferjani y colaboradores mostraron que varios eventos celulares pueden conducir a una compensación; por ejemplo, un incremento del tamaño en la fase mitótica, un incremento en la tasa de crecimiento celular durante la fase postmitótica o un crecimiento celular prolongado (Ferjani *et al.*, 2007). Sería interesante realizar estudios con estos factores de transcripción y genes involucrados en el proceso de compensación celular, pues de existir relación entre ambos, se podrían explicar los fenotipos que presentaron plantas como *wip4*, la cual tuvo un número menor de células, pero un mayor tamaño en la hoja de la roseta, comparado con la Wt. Para el caso de estas mutantes, parece tratarse incluso de una sobre-compensación, porque sus hojas tienen un tamaño final mucho mayor que las silvestres.

7.3 La arquitectura de los haces vasculares esta afectada en la doble mutante *wip2 wip5*

Los haces vasculares son los tejidos conductores que se encargan de transportar los nutrientes, agua, sales, etc., a toda la planta. La correcta formación de dichos tejidos es fundamental para el buen funcionamiento del organismo. De ahí la importancia de conocer el impacto que está teniendo la doble mutación en la vasculatura.

Al realizar previos análisis de lignificación en tallos en *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3*, *wip2 wip5* y *wip2 wip3 wip5*, fue evidente un patrón diferente en

wip2 wip5 (Díaz, 2015). Al realizar nuevos análisis para corroborar estos datos, no fue clara la diferencia que se había observado anteriormente. Sin embargo, para tener un conocimiento mas amplio acerca del tamaño del tallo y la arquitectura de los haces vasculares, en el presente trabajo se llevó a cabo la evaluación del diámetro de tallos, así como el número de haces vasculares en *wip2*, *wip5*, *wip2 wip5* y Wt. Al analizar los resultados del diámetro, se observa que *wip2* y *wip2 wip5* difieren entre si, y que *wip2 wip5* tiene diámetros de tallos similares a la Wt. Por otro lado en la evaluación del número de haces es *wip2 wip5* el que difiere de la Wt. ¿Qué mecanismos internos están ocurriendo en la planta que provocan que el número de haces vasculares en la doble mutante sea menor?, ¿Por qué estos cambios no son tan drásticos en las mutantes sencillas?, ¿Qué clase de interacción génica ocurre en los genotipos evaluados? Es difícil con los datos fenotípicos afirmar que los cambios se deban a un determinado proceso molecular. Sin embargo, estos datos abren la posibilidad de nuevos análisis que conduzcan a la obtención de mayor conocimiento de la causa de este fenotipo observado. Sería interesante primero conocer los posibles mecanismos moleculares que están siendo afectados, y segundo, buscar una forma de evaluar los efectos de estas afectaciones en la planta.

7.4 *WIP2* se expresa en tejidos jóvenes

En *Arabidopsis thaliana* ha sido reportada la función de *WIP2* en el tracto de transmisión, tejido por el cual crecen los tubos polínicos dentro del pistilo, así como en los meristemas de la raíz (Crawford *et al.*, 2015). En lo que se refiere al fruto de *Arabidopsis*, se ha observado que el promotor *WIP2* es activo durante el desarrollo del replum (Marsch-Martínez *et al.*, 2014). De acuerdo a estudios previos realizados en el laboratorio, se tiene conocimiento de que *WIP2* se expresa en la región medular del SAM, así como en los primordios de hoja del hipocótilo (Ramos, 2013). Por otro lado, se habían reportado alteraciones en el tallo y en el tiempo de floración que incluían a *wip2* (Díaz,2015). Sin embargo no se contaba con información sobre la expresión de *WIP2* en los tejidos involucrados, por lo que se decidió analizar su expresión en estos tejidos.

Para ello se hizo el análisis en plántulas a los 9 ddg y a los 40 ddg. En plántulas de 9 ddg se observó la expresión de *WIP2* en tejidos como la vasculatura del hipocotilo, y la vasculatura de las raíces. No se tenían reportes de expresión en este último tejido, por lo cual fue interesante seguirlo. Después en el análisis que se hizo a los 40 ddg, la expresión de *WIP2* se observó en la parte apical del tallo en los haces vasculares (probablemente en células del floema), en hojas caulinas jóvenes así como en pétalos de las flores. Es importante remarcar que este análisis de cortes de tallo se hizo en dos partes del tallo, en la parte apical y en la parte basal. Sin embargo la expresión de *WIP2* sólo pudo ser observada en los cortes de tallo de la parte apical de la planta. La parte apical del tallo corresponde a los tejidos que han sido formados más recientemente, lo que sugiere que este gen podría estar participando durante la formación de la vasculatura del tallo. Esto es interesante porque en el análisis de la arquitectura de la vasculatura del tallo, se observaron alteraciones en número de haces vasculares en la doble mutante *wip2 wip5*. Este trabajo complementa observaciones anteriores en el laboratorio que reportaron la actividad de *WIP2* en etapas tempranas de la planta y provee nueva información sobre sus posibles funciones.

La ausencia de este gen en la planta no provoca un fenotipo alterado muy notorio, permitiendo un crecimiento normal. La ausencia de un fenotipo alterado severo que comprometa el crecimiento normal en la planta en las etapas anteriormente analizadas, podría deberse a una posible redundancia genética. Para confirmar o descartar el anterior punto, sería interesante analizar la expresión de otros miembros de la familia, tomando en cuenta criterios como la cercanía filogenética (*WIP4* y *WIP5*).

Con las actuales observaciones se concluye que este gen se encuentra activo en la vasculatura de diferentes órganos tales como los tallos, hojas caulinas, pétalos y además la expresión se observa mayormente en tejidos jóvenes.

8- CONCLUSIONES

- ❖ Los factores de transcripción *WIP* influyen de manera ligera en el tiempo de floración. La pérdida de función de *WIP3* provocó un retraso en el número de días transcurridos desde la germinación hasta la aparición de los capullos de la inflorescencia (ddgf) en otoño. Por otro lado, la mutante *wip2 wip5* presentó un menor número de hojas en la roseta al florecer (nhf) comparado con la Wt. Falta aún conocer los mecanismos moleculares por los cuales estos factores de transcripción están regulando estas características en *Arabidopsis*.
- ❖ La presencia de los genes *WIP* en *Arabidopsis* es importante para controlar el crecimiento adecuado de la hoja de la roseta, y la carencia de uno o dos genes de la familia conduce a un tamaño final anormal de dichas hojas. El mayor tamaño en las hojas de la roseta en *wip4* y *wip2 wip5* se debe a que, aunque contienen un menor número de células en la epidermis, éstas tienen una mayor área, comparadas con las hojas de la planta silvestre.
- ❖ El genotipo *wip2 wip5* presentó un número menor de haces vasculares comparados con la planta silvestre, lo que sugiere que estos genes participan también en la determinación del número de haces vasculares que se forman en el tallo.
- ❖ Los resultados obtenidos en los análisis de la expresión de *WIP2* demuestran que este gen se expresa en diferentes etapas del desarrollo. La expresión de *WIP2* se observó en la vasculatura de diferentes órganos (hojas, pétalos, raíces) en las dos etapas de desarrollo que fueron analizadas (9 ddg y 40 ddg). Además, se encontró que *WIP2* se expresa en los haces vasculares de la parte apical del tallo, probablemente en células del floema.

9. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar un análisis de expresión diferencial de genes involucrados en la floración, con la mutante sencilla *wip3* y con la doble mutante *wip2 wip5*, comparándolas con plantas silvestres.
- ❖ Evaluar y comparar con plantas silvestres, la expresión de genes que estén involucrados en el control del tamaño de los órganos en *Arabidopsis* con las mutantes *wip4* y *wip2 wip5*.
- ❖ Obtener la mutante *wip2 wip4* y realizar evaluaciones fenotípicas como la medición del tamaño de las hojas, y del número y tamaño de sus células. Asimismo, evaluar estas características en la triple mutante *nww*.
- ❖ Identificar las células de los haces vasculares de los tallos en *pWIP2::GUS* que están siendo teñidas, para descartar o afirmar si son las células del floema.
- ❖ Hacer un barrido de cortes transversales de las líneas marcadoras *pWIP4::GUS* y *pWIP5::GUS* a diferentes etapas de desarrollo y diferentes distancias en el tallo; para conocer el patrón de expresión de estos genes y relacionarlos con los fenotipos observados en este trabajo.
- ❖ Evaluar el patrón de expresión de líneas marcadoras *pWIP4::GUS*, *pWIP5::GUS*, conocer los tejidos en donde se están expresando y compararlos con los resultados obtenidos en la línea marcadora *pWIP2::GUS* para poder predecir redundancia de funciones en otros tejidos.

10. LITERATURA CITADA

- ❖ Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. Elsevier Academic Press.
- ❖ Alberts, B., Johnson. A., Lewis, J., et al., Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Plant Development. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26922/>
- ❖ Amanda D., Doblin M., Galletti, R., Bacic A., Ingram G., y Johnson, K. 2016. *DEFECTIVE KERNEL1 (DEK1)* regulates cell walls in the leaf epidermis. Plant Physiology 172:2204-2218.
- ❖ Anastasiou, E., Kenz, S., Gerstung, M., MacLean, D., Timmer, J., Fleck, C., Lenhard, M. 2007. Control of plant organ size by KLUH/CYP78A5-dependent intercellular. Developmental Cell 13:843-856.
- ❖ Andrade, M. 2015. Comparando las funciones del factor de transcripción WIP de *Marchantia polymorpha* con genes WIP de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de maestría. CINVESTAV-Irapuato.
- ❖ Andres, F., and Coupland, G. 2012. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. Nature Reviews Genetics 13:627-639.
- ❖ Appelhagen, I., Huep, G., Lu, G-H., Strompen, G., Weisshaar, B. and Sagasser, M. 2010. Weird fingers: functional analysis of WIP domain proteins. FEBS Letters 584:3116-3122.
- ❖ Basile, A., Fambrini, M. and Pugliesi, C. Development Genes and Evolution 2017. doi:10.1007/s00427-016-0572-1.
- ❖ Bernier, G, Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A., Lejeune, P. 1993. Physiological signals that induce flowering. The Plant Cell 5:1147-1155.
- ❖ Bierhorst, D. W. 1971. Morphology of vascular plants. New York-London, MacMillan.
- ❖ Busch, W., Miotk, A., Ariel, F., Zhao Z., Forner, J., Daum, G., Suzaki, T., Schuster, C., Schultheiss, S., Leibfried, A., Haubeiss, S., Ha, N., Chan, R., Lohmann, J. 2010. Transcriptional control of a plant stem cell niche. Developmental Cell 18:849-861.
- ❖ Cutter, E. 1971. Plant anatomy: Experiment and Interpretation (Contemp. Biol. S). London.
- ❖ Chitwood D., Headland L., Kumar R., Maloof J., and Sinha R. 2012. The developmental trajectory of leaf morphology in wild tomato species. Plant Physiology 158:1230-1240.
- ❖ Crawford, B., Ditta, G., and Yanosky, M. 2007. The *NTT* gene is required for transmitting-tract development in carpels of *Arabidopsis thaliana*. Current Biology 17:1101-1108.
- ❖ Crawford, B., Sewell, J., Golembeski, G., Roshan, C., Long, J. and Yanofsky, F. 2015. Genetic control of distal stem cell fate within root and embryonic meristems. Science 347:655-659.

- ❖ Díaz, D. 2015. Análisis del efecto fenotípico de la disminución de la función de la familia génica *WIP* en *Arabidopsis*. Tesis de maestría. CINVESTAV-Irapuato.
- ❖ Dolan, L. 1997. SCARECROW: specifying asymmetric cell divisions throughout development. *Trends in Plant Science* 2:1-2.
- ❖ Dong, J.; Bergmann, D. 2010. Stomatal Patterning and Development. *Current Topics in Developmental Biology* 91:267-297.
- ❖ Donnelly, P., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R., and Dengler, N. 1999. Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Developmental Biology* 215:407–419.
- ❖ Efroni, I., Eshed, Y., and Lifschitz, E. 2010. Morphogenesis of simple and compound leaves: a critical review. *Plant Cell* 22:1019–1032.
- ❖ Efroni, I., Blum, E., Goldshmidt, A., and Eshed, Y. 2008. A protracted and dynamic maturation schedule underlies *Arabidopsis* leaf development. *Plant Cell* 20:2293–2306.
- ❖ Englbrecht, C., Schoof, H., y Bohm, S. 2004. Conservation, diversification and expansion of C2H2 zinc finger proteins in the *Arabidopsis thaliana* genome. *BMC Genomics* 5:39. doi 10.1186/1471-2164-5-39.
- ❖ Esau, K. 1977. *Anatomy of seed plants*. New York, Wiley.
- ❖ Ewers, F. 1982. Secondary growth in needle leaves of *Pinus longaeva* (bristlecone pine) and other conifers: Quantitative data. *American Journal of Botany* 69:1552-1559.
- ❖ Ferjani A., Horiguchi G., Yano S., Tsukaya H. 2007. Analysis of leaf development in fugu mutants of *Arabidopsis* reveals three compensation modes that modulate cell expansion in determinate organs. *Plant Physiology* 144:988–999.
- ❖ Fosket, D., Hardham, A., Silk, W. and Veit, B. 2010. Growth and Development. In: *Plant Physiology*, ed. L. Taiz and E. Zeiger. Sinauer 5th ed., 455-456.
- ❖ Font Quer, P. 1982. *Diccionario de Botánica*. 8ª reimpression. Barcelona: Editorial Labor, S. A. ISBN 84-335-5804-8.
- ❖ Fournier, C., Durand, J., Ljutovac, S., Schäufele, R., Gastal, F., Andrieu, B. 2005. A functional–structural model of elongation of the grass leaf and its relationships with the phyllochron. *New Phytology* 166:881-894.
- ❖ Flood, P., Harbinson, J., and Aarts, M. 2011. Natural genetic variation in plant photosynthesis. *Trends in Plant Science* 16,327–335. doi:10.1016/j.tplants.2011.02.005.
- ❖ Flores-Vindas E. 2013. *La Planta*. Costa Rica: LUR Libro Universitario Regional.
- ❖ Francis, D.; Dudits, D.; Inze, D. 1998. *Cell cycling in top gear*. Portland, Portland Press.
- ❖ Fridman, Y., and Savaldi-Goldstein, S. 2013. Brassinosteroids in growth control: how, when and where. *Plant Science* 209: 24–31.
- ❖ Gonzalez, N., Vanhaeren, H., Inzé, D. 2012. Leaf size control: complex coordination of cell division and expansion. *Trends in Plant Science* 17:332-340.

- ❖ Grossniklaus, U.; Vielle-Calzada, J. 1998. Parental conflict and infanticide during embryogenesis. *Trends in Plant Science* 3:328. doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01294-1.
- ❖ Guimil, S., Dunand, C. 2007. Cell growth and differentiation in *Arabidopsis* epidermal cells. *Journal of Experimental Botany* 58:3829-3840.
- ❖ Haig, D.; Westoby, M. 1991. Genome imprinting in endosperm: its effects on seed development in crosses between species and between different ploides of the same species, and its implications for the evolution of apomixis. *Philosophical Transaction of the Royal Society. London Ser.B.* 333:1-13.
- ❖ Hagemann, W., and Gleissberg, S. 1996. Organogenetic capacity of leaves: The significance of marginal blastozones in angiosperms. *Plant Systematics and Evolution* 199:121-152.
- ❖ Hegland, S., Nielsen, A., Lazaro, A., Bjerknes, A., and Totland, O. 2009. How does climate warming affect plant-pollinator interactions? *Ecology Letters* 12:184-195.
- ❖ Holsinger, K. 2000. Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 97:7037-7042.
- ❖ Horiguchi, G., Ferjani, A., Fujikura, U., Tsukaya, H. et al., 2006. Coordination of cell proliferation and cell expansion in the control of leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* 119: 37-42.
- ❖ Horiguchi, G., Kim, G-T., Tsukaya, H. 2005. The transcription factor AtGRF5 and the transcription coactivator AN3 regulate cell proliferation in leaf primordia of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 43:68-78.
- ❖ Horiguchi, G., Yano, S., Tsukaya, H. 2007. Analysis of leaf development in fugu mutants of *Arabidopsis* reveals three compensation modes that modulate cell expansion in determinate organs. *Plant Physiology* 144:988–999.
- ❖ Horvitz, H., Herskowitz, I. 1992. Mechanism of asymmetric cell division: two Bs of not to Bs, that is the question. *Cell* 88:237-255.
- ❖ Hu, Y., Xie, Q., Chua, N-H. 2003. The *Arabidopsis* auxin inducible gene *ARGOS* controls lateral organ size. *Plant Cell* 15:1951-1961.
- ❖ Johnson, K., and Lenhard, M. 2011. Genetic control of plant organ growth. *New Phytologist* 191:319–333.
- ❖ Kenrick, P. 2000. The relationship of vascular plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 355:847-855.
- ❖ Kim, D., Doyle, M., Sung, S., and Amasino, R. 2009. Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25:277-299.
- ❖ Kim, J., Kende, H. .2004. A transcriptional coactivator AtGIF1 is involved in regulating leaf growth and morphology in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101:13374-13379.
- ❖ Kim, J., Choi, D., Kende, H. 2003. The AtGRF family of putative transcription factors is involved in leaf and cotyledon growth in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 36:94-104.
- ❖ Kobayashi, Y., and Weigel, D. 2007 Move on up, it's time for Change mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. *Genes & Development* 21:2371-2384.

- ❖ Kosuka, T., Horiguchi, G., Kim, G-T., Ohgishi, M., Sakai, T., Tsukaya, T. 2005. The different growth responses of the *Arabidopsis thaliana* leaf blade and the petiole during shade avoidance are regulated by photoreceptors and sugar. *Plant Cell Physiology* 46:213-223.
- ❖ Koornneef, M., Hanhart, C., and Van der veen, J. 1991. A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* 229:57-66.
- ❖ Laity, J., Lee, B., and Wrigh, P. 2001. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current Opinion in Structural Biology* 11:39-46.
- ❖ Malinowski, R. 2013. Understanding of Leaf Development—the Science of Complexity. *Plants* 2(3):396-415.
- ❖ Martin, A., Troadec, C., Boualem, A., Rajab, M., Fernandez, R., Morin, H., Pitrat, M., Dogimont, C. and Bendahmane, A. 2009. A transposon-induced epigenetics change leads to sex determination in melon. *Nature* 461:1135-1138.
- ❖ Marsch-Martínez, N., Zuñiga-Mayo, V., Herrera-Ubaldo, H., Ouwerkerk, P., Pablo-Villa, J. et al., 2014. The NTT Transcription Factor promotes replum development in *Arabidopsis* fruits. *The Plant Journal* 80:69-81.
- ❖ Mauseth, J. 1988. *Plant Anatomy*. Benjamin/Cummings Pub.Co. Menlo Park, CA.
- ❖ Mizukami, Y. 2001. A matter of size: developmental control of organ size in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 4:533-539.
- ❖ Mizukami, Y., Fisher, R. 2000. Plant organ size control: *AINTEGUMENTA* regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:942-947.
- ❖ Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–497.
- ❖ Nelissen, H., Rymen, B., Coppens, F., Dhondht, S., Fiorani, F., Beemster, G. 2013. Kinematic analysis of cell division in leaves of mono- and dicotyledonous species: A basis for understanding growth and developing refined molecular sampling strategies. *Methods in Molecular Biology* 959:247-264.
- ❖ Nicotra, A., Leigh, A., Boyce, C., Jones, C., Niklas, C., Royer, D., Tsukaya, H. 2011. The evolution and functional significance of leaf shape in the angiosperm. *Functional Plant Biology* 38:535-552.
- ❖ Pabo, C., Sauer, R. 1992. TRANSCRIPTION FACTORS: Structural Families and Principles of DNA Recognition. *Annual Review of Biochemistry* 61:1053-1095.
- ❖ Perreta, M., y Vegetti, A. 2005. Patrones estructurales en las plantas vasculares: Una Revisión. *Gayana. Bot.*, vol.62, no.1, p.9-19. ISSN 0717-6643.
- ❖ Petricka, J., Clay, N. and Nelson, T. 2008. Vein patterning screens and the defectively organized tributaries mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 56:251-263.
- ❖ Ramos-Cruz, D. 2013. Localización e interacciones de WIP2 en el contexto de meristemo. Tesis de maestría. CINVESTAV-Irapuato.

- ❖ Rasband, W., 1997-2014. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- ❖ Raven, P., Evert, R., and Eichhorn, S. 1992. *Biology of Plants*, 5th. ed. Worth Publishers.
- ❖ Roeder, A., Ferrándiz, C. and Yanofsky, M. 2003. The role of the REPLUMLESST Homeodomain Protein in Patterning the *Arabidopsis* fruit. *Current Biology* 13: 1630-1635.
- ❖ Sack, L., Scoffoni, C., McKown, A., Frole, K., Rawls, M., Havran, J., Tran, H., Tran, T. 2012. Developmentally based scaling of leaf venation architecture explains global ecological patterns. *Nature Communications* 3:837.
- ❖ Sagasser, M., Lu, G.-H., Hahlbrock, K. and Weisshaar, B. 2002. *A. thaliana* TRANSPARENT TESTA 1 is involved in seed coat development and defines the WIP subfamily of plant zinc finger protein. *Genes & Development* 16:138-149.
- ❖ Sattler, R., Rutishauser, R. 1997. The fundamental relevance of Morphology and Morphogenesis to plant research. *Annals of Botany* 80:571-582.
- ❖ Song, Y., Shim, J., Kinmonth-Schultz, H., and Imaizumi, T. 2015. Photoperiodic flowering: time measurement mechanisms in leaves. *Annual Review of Plant Biology* 66:441-464
- ❖ Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., and Coupland, G. 2001. CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410:1116-1120
- ❖ Steeves, T. and Sussex, I. 1989 Patterns in plant development. *Nordic Journal of Botany*. DOI: 10.1111/j.1756-1051.1991.tb01820.x
- ❖ Statgraphics Centurion XVI 32-bit. Consultado Agosto 2016. <http://www.statgraphics.net/descargas/>
- ❖ Stomp A. 1992. Histochemical detection of GUS: In. *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. Gallagher S. A. (ed). Academic Press Inc. San Diego. pp: 103-113.
- ❖ Taiz, L., and Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology*, 3rd ed (Sinauer Associates).
- ❖ Tourn, G., Barthélémy D., y Grosfeld, J. 1999. Una aproximación a la arquitectura vegetal: conceptos, objetivos y metodología. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 34: 85-99.
- ❖ Turner, S., and Sieburth, L. 2003. Vascular Patterning. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 2, e0073. <http://doi.org/10.1199/tab.0073>.
- ❖ Tsukaya, H. 2002. Interpretation of mutants in leaf morphology genetic evidence for a compensatory system in leaf morphogenesis that provides a new link between cell and organismal theories. *International Review of Cytology* 217:1-39.
- ❖ Tsukaya, H. 2014. "Meristems" in *Atlas of Plant Cell Structure*, eds T. Noguchi, S. Kawano, H. Tsukaya, S. Matsunaga, A. Sakai, I. Karahara, and Y. Hayashi. Tokyo: Springer, 187–202.

- ❖ Vanhaeren, H., Inzé, D. and González, N. 2016. Plant growth beyond limits. *Trends in Plant Science* 21:102-109.
- ❖ Wareing, P., Phillips, I. 1978. *The control of growth and differentiation in plants*. 2 ed. New York, Pergamon Press.
- ❖ Wardlaw, C. 1968. *Morphogenesis in plants. A Contemporary study*. Second edition, London, Methuen.
- ❖ Weigel, D., and Glazebrook, J. 2002. *How to Analyze a Mutant Phenotypically in Arabidopsis. A Laboratory Manual* (96,97). United State of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- ❖ Wolfe, S., Nekludova, L. and Pablo, C. 2000. DNA recognition by Cys2His2 Zinc finger proteins. *Annual Review Biophysics and Biomolecular Structure* 3:183-212.
- ❖ Yang, W., Schuster, C., Beahan, C., Charoensawan, V., Peaucelle, A., Bacic, A., Doblin, M., Wightman, R., Meyerowitz, E. 2016. Regulation of meristem morphogenesis by cell wall synthases in *Arabidopsis*. *Current Biology* 26:1404–1415.
- ❖ Yuan, L., Perry, S.(eds.). *Plant Transcription Factors, Methods in Molecular Biology* 754, DOI 10. 1007/978-1-61779-154-3_1, Springer Science+Business Media, LLC 2011.

11. ANEXOS

1)-Tiempo de floración *wip2*, *wip3*, *wip2 wip3* y *Wt*.

A)- Días de aparición de los capullos de la inflorescencia

Hipótesis nula	Prueba estadística	Valor de la prueba	Decisión	
Entre los genotipos la distribución de los días de la floración es la misma	Kruskal-Wallis	0.000025914	Se rechaza la hipótesis nula	0.05

Genotipo	a	b
Grupo estadístico		
<i>Wt</i>	37.611	
<i>wip2</i>	40.604	
<i>wip3</i>		60.104
<i>wip2 wip3</i>	26.444	

B)- Número de hojas en la roseta

Hipótesis nula	Prueba estadística	Valor de la prueba	Decisión	
Entre los genotipos la distribución de número de hojas es la misma	Kruskal-Wallis	0.077	Se acepta la hipótesis nula	0.05

2)-Tiempo de floración *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3*, *wip2 wip5* y *Wt*.

A) Días de aparición de los capullos de la inflorescencia

Hipótesis nula	Prueba estadística	Valor de la prueba	Decisión	
Entre los genotipos la distribución de los días de la floración es la misma	Kruskal-Wallis	0.001	Se rechaza la hipótesis nula	0.05

Genotipo	a	b
Grupo estadísticos		
<i>Wt</i>	71.239	71.239
<i>wip2</i>		101.452
<i>wip3</i>		86
<i>wip4</i>		87.550
<i>wip5</i>		80.196
<i>wip2 wip3</i>		78.413
<i>wip2 wip5</i>	43.625	

B)- Número de hojas en la roseta

Hipótesis nula	Prueba estadística	Valor de la prueba	Decisión	
Entre los genotipos la distribución del número de hojas es la misma	Kruskal-Wallis	0.001	Se rechaza la hipótesis nula	0.05

Genotipo	a	b
Grupo estadísticos		
Wt		79.391
wip2		89.524
wip3		90.425
wip4		88.925
wip5		66.522
wip2 wip3		90.239
wip2 wip5	43.188	

3)-Área de la hoja de la roseta 30 ddg wip2, wip3, wip4, wip5, wip2 wip3, wip2, wip5 y Wt

Tabla de ANOVA	Suma de los cuadrados	Df	Media de los cuadrados	F-Ratio	P-Value
Entre grupos	16710.7	6	2785.11	3.04	0.0113
Dentro de grupos	57789.8	63	917,298		
Total (Corr.)	74500.4	69			

Genotipo Gpo. Estadístico LSD	a	b	c
Wt			134.78
wip2	95.3632	95.3632	
wip3		116.217	116.217
wip4	96.6838	96.6838	
wip5	86.5583		
wip2 wip3	102.539	102.539	
wip2 wip5		118.629	118.629

4)-Área de las células de la epidermis a los 30ddg wip2, wip3, wip4, wip5, wip2 wip3, wip2, wip5 y Wt

Tabla de ANOVA	Suma de los cuadrados	Df	Media de los cuadrados	F-Ratio	P-Value
Entre grupos	9.48014E6	6	1.58002E6	4.13	0.0008
Dentro de grupos	5.09026E7	133	382726		
Total (Corr.)	6.03828E7	139			

Genotipo Gpo. Estadístico LSD	a	b	c
Wt	2820.5	2820.5	
wip2		3101.18	3101.18
wip3			3377.23
wip4		3200.79	3200.79
wip5	2512.42		
wip2 wip3		3025.79	3025.79
wip2 wip5		3118.4	3118.4

5)-Número de células en la hoja a 30 ddg *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3*,

wip2, *wip5* y Wt

Tabla de ANOVA	Suma de los cuadrados	Df	Media de los cuadrados	F-Ratio	P-Value
Entre grupos	5.96592E13	6	9.94319E12	2.09	0.0215
Dentro de grupos	2.99606E14	63	4.75564E12		
Total (Corr.)	3.59265E14	69			

Genotipo Gpo. Estadístico LSD	a	b	c
Wt			6.15E+06
<i>wip2</i>	3.49E+06		
<i>wip3</i>	4.19E+06	4.19E+06	
<i>wip4</i>	3.83E+06		
<i>wip5</i>	3.80E+06		
<i>wip2 wip3</i>	4.52E+06	4.52E+06	4.52E+06
<i>wip2 wip5</i>		5.99E+06	5.99E+06

6)-Área de la hoja de la roseta 60 ddg *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2 wip3*, *wip2*,

wip5 y Wt

Tabla de ANOVA	Suma de los cuadrados	Df	Media de los cuadrados	F-Ratio	P-Value
Entre grupos	121261	6	20210.2	2.93	0.0141
Dentro de grupos	420622	61	6895.44		
Total (Corr.)	541883	67			

Genotipo Gpo. Estadístico LSD	a	b	c
Wt	220.168		
<i>wip2</i>		302.359	302.359
<i>wip3</i>	246.594	246.594	
<i>wip4</i>			319.039
<i>wip5</i>	316.848	316.848	
<i>wip2 wip3</i>	255.27	255.27	
<i>wip2 wip5</i>			345.331

7)-Área de las células de la epidermis a los 60ddg *wip2*, *wip3*, *wip4*, *wip5*, *wip2*

wip3, *wip2*, *wip5* y Wt

Tabla de ANOVA	Suma de los cuadrados	Df	Media de los cuadrados	F-Ratio	P-Value
Entre grupos	5.61034E7	6	9.35056E6	20.41	0.0001
Dentro de grupos	6.09251E7	133	458083		
Total (Corr.)	1.17028E8	139			

Genotipo Gpo. Estadístico LSD	a	b	c	d
Wt	2879.73			
<i>wip2</i>		3411.22	3411.22	
<i>wip3</i>		3310.51	3310.51	
<i>wip4</i>				4519.49
<i>wip5</i>			3708.85	
<i>wip2 wip3</i>	3004.07	3004.07		
<i>wip2 wip5</i>				4580.33

8)-Número de células de epidermis de la hoja a los 60ddg *wip2*, *wip3*, *wip4*,

wip5, *wip2 wip3*, *wip2*, *wip5* y *Wt*

Tabla de ANOVA	Suma de los cuadrados	Df	Media de los cuadrados	F-Ratio	P-Value
Entre grupos	3.8785E1 4	6	6.46417E1 3	4.27	0.0012
Dentro de grupos	9.22999E14	61	1.51311E13		
Total (Corr.)	1.31085E15	67			

Genotipo Gpo. Estadístico LSD	a	b	c	d
<i>Wt</i>			1.16945E7	1.16945E7
<i>wip2</i>		1.02295E7	1.02295E7	1.02295E7
<i>wip3</i>	9.13618E6	9.13618E6	9.13618E6	
<i>wip4</i>	6.2831E6			
<i>wip5</i>	9.26591E6	9.26591E6	9.26591E6	
<i>wip2 wip3</i>				1.35645E7
<i>wip2 wip5</i>	6.87577E6	6.87577E6		

9)-Prueba de ANOVA para evaluación del diámetro de los tallos de *Arabidopsis*

Tabla de ANOVA	Suma de los cuadrados	Df	Media de los cuadrados	F-Ratio	P-Value
Entre grupos	1.53071	3	0.510236	2.07	0.0282
Dentro de grupos	8.87664	36	0.246573		
Total (Corr.)	10.4074	39			

Genotipo Gpo. Estadístico LSD	a	b
<i>Wt</i>	0.957143	0.957143
<i>wip2</i>	0.553	
<i>wip5</i>	0.889	0.889
<i>wip2 wip5</i>		1.20273

10)-Prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación del número de haces en los tallos de *Arabidopsis*

Hipótesis nula	Prueba estadística	Valor de la prueba	Decisión
Entre los genotipos la distribución del número de haces es la misma	Kruskal-Wallis	0.02	Se rechaza la hipótesis nula